

TESIS DE DOCTORADO
**ESTUDIO DEL PAPEL DE LA VÍA
DE LOS RETINOIDES EN LA
PATOGENIA DE LA ARTRITIS
REUMATOIDE**

Nerea M^a Mosquera Garrote

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2018



DECLARACIÓN DE LA AUTORA DE LA TESIS
ESTUDIO DEL PAPEL DE LA VÍA DE LOS
RETINOIDES EN LA PATOGENIA DE LA
ARTRITIS REUMATOIDE

Dña. Nerea Mª Mosquera Garrote

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, 6 de abril de 2018

Fdo. Nerea Mª Mosquera Garrote



**AUTORIZACIÓN DE LA DIRECTORA /
TUTORA DE LA TESIS
ESTUDIO DEL PAPEL DE LA VÍA DE LOS
RETINOIDES EN LA PATOGENIA DE LA
ARTRITIS REUMATOIDE**

Dña. Carmen Conde Muro

INFORMA:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. Nerea M^a Mosquera Garrote, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directora de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 6 de abril de 2018

Fdo. Carmen Conde Muro





A mis padres



Creo que no es posible expresar todo lo que significáis para mí, así que antes de que empecéis a leer esto, quiero que sepáis que os merecéis mucho más de lo que aquí os agradezco.

Si hoy estoy escribiendo estas líneas es gracias a la Dra. Carmen Conde, sin ella no habría llegado hasta aquí. Carmen, quiero agradecerte muchas cosas, la primera que me dieras la oportunidad de hacer esta tesis y también la confianza que necesitaba para conseguirlo. Siempre he sentido que podía contar contigo tanto a nivel laboral como personal, porque me has enseñado, guiado, apoyado y ayudado en todos los aspectos de mi vida. Por eso, sin dudarlo, creo que he tenido mucha suerte al tenerte como directora de tesis, has hecho que esta etapa, difícil de por sí, haya sido mucho más fácil. Gracias de corazón. Al Dr. Antonio González quiero agradecerle su ayuda con la estadística y otras múltiples dudas que siempre ha resuelto, sacándonos de muchos apuros. Gracias a los dos.

Si gracias a una Carmen pude empezar esta etapa, fue gracias a otra Carmen que la pude terminar a tiempo. Aunque probablemente no lo recuerdes, el día que viniste a campana a “reñirme” porque no te pedía ayuda, estaba apunto de entrar en colapso, y si no llega a ser por ti, creo que me habría desintegrado en ese mismo instante. De ahí en adelante te convertiste en mi compañera de laboratorio y en mucho más. Quizá tengas razón y al trabajo no se viene a hacer amigos, pero el roce hace el cariño y tú y yo nos hemos rozado mucho. Hoy, quiero confesarte que en alguna ocasión me las podía haber apañado sola con los ratones, pero ir contigo era mucho mejor. Contigo todo ha sido mucho mejor, sin duda más rápido y más fácil, pero sobretodo más divertido. Aunque a nivel personal, mucha gente me ha apoyado, tú has estado a todos los niveles y si a alguien le tengo que agradecer su ayuda en esta tesis es a ti, has sido mi mano derecha e izquierda, casi una prolongación de mí. Gracias Carmen.

Y entre esa gente que me ha apoyado a nivel personal, está como no Laura, el terremoto humano, que cambió mi vida por completo. Cuando sentí que mi vida se desmoronaba, apareciste tú, tú fuiste la que le pidió ayuda a Carmen por mí, la que me explicó a la vez los entresijos del Excel y del ligoteo, la que con su gran sinceridad me dijo que estaba igual de verde que una lechuga y que tenía que espabilar... en general, tú le diste un vuelco a mi vida y me ayudaste a madurar. Gracias por ser mi gran confidente, por no juzgarme nunca y por estar siempre, siempre, siempre que te he necesitado. Eres la definición de una gran amiga.

Y después de estos dos agradecimientos entenderéis que cuando Laura y Carmen dejaron el laboratorio pensara ¡qué va a ser de mí! pero apareció Ángela. Primero pensé, qué coñazo, otra vez a explicarle todas las técnicas a alguien nuevo, ahora que estoy sola y encima me queda nada para terminar. Pero tú eras diferente, mucho más de lo que yo me esperaba. Me demostraste que eras lista, trabajadora y muy espabilada, por lo que en menos que canta un gallo te hiciste cargo del laboratorio. Gracias, porque si tuve tiempo para escribir esta tesis, es porque tú te encargaste de todo lo demás. Ángela, en ti encontré a mi compañera de cafés, estrellas, conciertos, piscina, caminata, confidencias, youtubers...encontré una amistad que durará años. Gracias por ser como eres, morena.

Por otro lado, no me puedo olvidar de mis primeros maestros, Sandra, Vane y Diego que me hicieron sentir como una más desde que me acogieron de prácticas hasta hoy. Gracias a vosotros aprendí muchas técnicas, sobretodo los posibles, probables y tan recurrentes fallos del western blot. Sin embargo, lo mejor que me habéis enseñado es el compañerismo y lo divertido que puede ser estar en un laboratorio con vosotros. Gracias chicos.

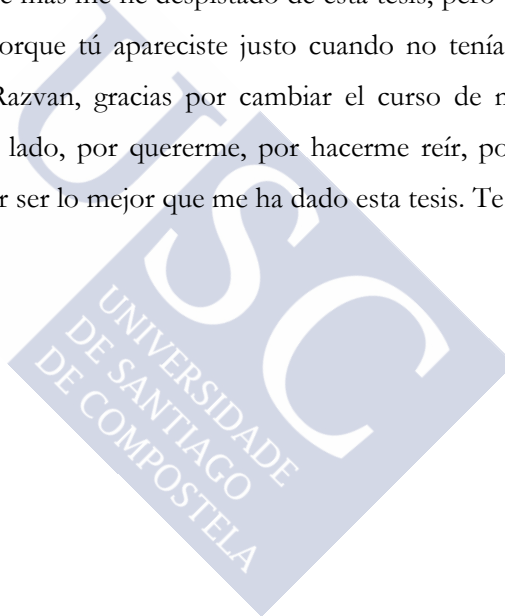
Gracias también a Cris y a Lorena. Siempre habéis sido unas buenas compañeras de trabajo, pero sin duda os quiero agradecer las aventuras vividas, nunca olvidaré nuestro gran viaje juntas, el EULAR, donde de verdad descubrí lo geniales que sois. Por toda su ayuda y paciencia con la proteómica quiero darle las gracias a Susana y a las chicas del CIMUS, María, Irene y Lidia, a las que también les quiero agradecer ser tan simpáticas y divertidas. Gracias por su compañerismo y buen humor a otra gente que he conocido durante esta etapa, como Aida, María García, Ana Cardio, Marta “Confocal”, Rosario, Adrián, Cris Castro, Alana o Sonia. Y aunque no sé si llegarán a leer estas líneas gracias también a mis chicos de prácticas que tanto me han hecho reír con sus “metepatas”. Leti por según ella tenerlo todo hecho, aunque no sabía que tenía que hacer, Celia, por el lío que montó rotulando tubos, Samu y Bea por sus problemas con la PCR o Rebeca por el gota a gota. Aunque la palma se la lleva Sergio, que tiró un mes de experimentos a la basura literalmente, pero que se lo perdono todo por su alegría y por llamarme siempre Jefa. Os cogí mucho cariño y espero que os vaya muy bien en la vida.

A quién también quiero agradecerle su apoyo es a mis amigas de toda la vida, Lore, Loli, Vane, Salo... Quizá no tenéis ni idea de lo que va esta tesis, pero habéis estado a mi lado durante esta etapa, haciendo que me olvide y me ría de los problemas del día a día. Sé que siempre puedo contar con vosotras y eso es algo que muy pocas personas pueden decir de sus amigas. Muchas gracias por ser como sois.

Sin duda, los mayores agradecimientos de esta tesis son para mi familia. Papá, Mamá, gracias por vuestro sacrificio para que pudiera estudiar. Sé que queráis que tuviese un trabajo que me gustase y que me diese independencia, y aunque ahora mismo no lo tenga, os prometo que lo tendré y será gracias a vuestro esfuerzo. Si no fuera por la educación que me disteis no habría llegado a dónde estoy, por eso esta tesis es tan mía como vuestra. Gracias por todo, os quiero. A quienes también

les corresponde un pedacito de esta tesis es a mis abuelos. Por ayudarme para que estudiase en León, por ponerme velas para los exámenes, por preocuparos por mí... en definitiva por cuidarme como si fuera una hija. Gracias abuelos. A mis tíos, padrinos, primos y ahijadas quiero daros las gracias, porque es por la gente que se quiere por la que se lucha para que las cosas salgan bien. Asimismo, espero que esté donde esté mi bisabuela sepa que esta tesis también le corresponde.

Por último, pero no menos importante, quiero darle las gracias a mi marido. Quizá has sido el motivo por el que más me he despidado de esta tesis, pero también por el que más feliz he sido. Porque tú apareciste justo cuando no tenía ilusión por nada y me lo diste todo. Razvan, gracias por cambiar el curso de mi vida, por escucharme, por estar a mi lado, por quererme, por hacerme reír, por mil y una razones, pero sobretodo, por ser lo mejor que me ha dado esta tesis. Te quiero.



ESTUDIO DEL PAPEL DE LA VÍA DE LOS RETINOIDES EN LA PATOGENIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune que afecta a una fracción significativa de la población y ocasiona dolor e incapacidad a las personas que la padecen. La producción de mediadores inflamatorios son claves en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación articular que junto con la hiperplasia sinovial llevan a la destrucción progresiva de la articulación y a la incapacidad permanente. Los tratamientos actuales dirigidos frente a citoquinas inflamatorias, células B o frente a moléculas implicadas en la activación de células T, han mejorado el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, alrededor de un 30% de pacientes no responde adecuadamente a las nuevas terapias. Por lo tanto, todavía es necesario profundizar en el conocimiento de todos los actores y mecanismos implicados en la patogenia de la AR, con el fin de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Distintas evidencias indican que los retinoides y la proteína CRABP2 podrían tener un papel en la patogenia de la AR, teniendo en cuenta que la alteración del balance supervivencia/apoptosis es clave en la hiperplasia sinovial. En efecto, numerosos estudios han mostrado que los retinoides pueden inducir un efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico en distintos tipos de cáncer, a través de su transportador, CRABP2. En este trabajo se demuestra la regulación no convencional e idiosincrática de los retinoides en los sinoviocitos de pacientes con AR. El retinoide ATRA no tuvo un efecto anti-proliferativo, ni pro-apoptótico, como se esperaba, incluso a pesar de poseer una expresión elevada de *CRABP2*. Sin embargo, el tratamiento con ATRA redujo el fenotipo agresivo de los sinoviocitos, al inhibir su capacidad migratoria y de invasión, mediante la regulación transcripcional de genes implicados en estos procesos, entre los que destacan *VCAM1*, *PTX3*, *MMP1* y *CX3CL1*. Asimismo, el retinoide moduló la respuesta

RESUMEN DE LA TESIS

inflamatoria de los sinoviocitos reumatoides aumentando la expresión de algunos mediadores inflamatorios como IL-1 β e IL-8 y reduciendo otros determinantes en los procesos de quimioatracción. El efecto de ATRA en un modelo experimental de artritis se analizó mediante la inyección de suero K/BxN en ratones y el tratamiento con el retinoide. Los resultados mostraron que ATRA agravó la enfermedad tanto a nivel clínico como histológico. Estos resultados indican que la reducción de la migración e invasión de los fibroblastos sinoviales, y de algunos mediadores quimiotácticos no son suficientes para el control de la artritis. La persistencia de importantes citocinas en la articulación puede ser clave en este fracaso terapéutico.

Por otro lado, el transportador de retinoides, *CRABP2*, parece contribuir a la resistencia de los sinoviocitos reumatoides a la apoptosis, puesto que su silenciamiento sensibilizó estas células a la apoptosis inducida por Fas. El aumento de expresión de ASK1 y la disminución de ERK fueron responsables de este efecto. Además, los sinoviocitos reumatoides deficientes en *CRABP2* fueron más sensibles a la apoptosis mediada por Fas que los controles aún en presencia de mediadores inflamatorios como TNF o IL-1 β . El análisis del papel de *CRABP2* en un modelo murino de artritis, mediante la inyección de suero K/BxN en ratones *crabp2* deficientes, no mostró diferencias en la severidad de la artritis entre ratones controles y deficientes. Estos datos indican que el aumento de la sensibilidad a la apoptosis en los sinoviocitos reumatoides no es suficiente para vencer otros factores que participan en la patogenia de la artritis experimental.



ÍNDICE



INTRODUCCIÓN	1
A. ARTRITIS REUMATOIDE	3
1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO	4
2. EPIDEMIOLOGÍA	6
3. ETIOLOGÍA	8
3.1. Factores genéticos	8
3.2. Factores epigenéticos	10
3.3. Factores ambientales	12
4. PATOGENIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE	14
5. MECANISMOS MOLECULARES	21
5.1. Vías de señalización intracelular	21
5.2. Factores de transcripción	28
6. LA MEMBRANA SINOVIAL	30
7. CARACTERÍSTICAS PATOGENICAS DE LOS SINOVIOCITOS TIPO FIBROBLASTO EN LA ARTRITIS REUMATOIDE	32
7.1. Proliferación y apoptosis en sinoviocitos reumatoides	32
7.2. Migración e invasión de sinoviocitos reumatoides	38
8. ESTRATEGIA TERAPÉUTICA EN LA ARTRITIS REUMATOIDE	40
B. VITAMINA A	45
1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA VITAMINA A	45
2. ABSORCIÓN, METABOLISMO Y DISTRIBUCIÓN	47
3. METABOLITOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS DE LA VITAMINA A	49
3.1. 11-cis retinal	50
3.2. Ácido retinoico	50
4. PAPEL DEL ÁCIDO RETINOICO Y DE LAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL	52
4.1. El transportador CRABP2	53
4.2. El transportador FABP5	55

5. EFECTOS EXTRANUCLEARES DEL ÁCIDO RETINOICO	55
6. EFECTOS FUNCIONALES DE LOS RETINOIDES	56
6.1. Proliferación celular	56
6.2. Apoptosis celular	58
6.3. Migración e invasión	62
6.4. Respuesta inflamatoria	63
7. IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE LOS RETINOIDES EN LA ARTRITIS REUMATOIDE	64

OBJETIVOS 67

MATERIALES Y MÉTODOS 71

1. CULTIVO CELULAR DE FLS	73
2. RATONES	74
3. TIPADO DE RATONES MEDIANTE PCR	75
4. INDUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE ARTRITIS EN EL MODELO MURINO	79
5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO	80
6. TRATAMIENTOS	81
7. SILENCIAMIENTO DE LOS GENES <i>CRABP2</i> Y <i>FABP5</i> EN SINOVIOCITOS REUMATOIDES	82
8. ENSAYOS DE APOPTOSIS	82
9. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN	83
10. ENSAYO MIGRACIÓN	84
11. ENSAYO INVASIÓN	85
12. ENSAYO DE DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS EN SOBRENADANTE DE CÉLULAS	86
13. EXTRACCIÓN DE ARN	86
14. ARRAYS	87
15. PCR EN TIEMPO REAL CON TRANSCRIPTASA INVERSA (qRT-PCR)	89
16. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	91

17. WESTERN BLOT	91
18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	92

RESULTADOS	93
-------------------	-----------

1. EFECTO DE ATRA EN LA PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS DE LOS SINOVIOCITOS REUMATOIDES	95
2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CRABP2 Y FABP5 EN SINOVIOCITOS REUMATOIDES	97
3. LA AUSENCIA DE CRABP2 SENSIBILIZA A LOS SINOVIOCITOS REUMATOIDES A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR FAS	98
4. LA DEFICIENCIA DE <i>CRABP2</i> SENSIBILIZA A LOS SINOVIOCITOS REUMATOIDES A LA APOPTOSIS MEDIANTE LA SOBREEXPRESIÓN DE ASK1, DE pJNK Y LA REPRESIÓN DE ERK	101
5. EFECTO DE LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR FAS EN SINOVIOCITOS REUMATOIDES DEFICIENTES EN <i>CRABP2</i>	102
6. EL TRATAMIENTO CON ATRA INHIBE LA CAPACIDAD DE INVASIÓN DE LOS SINOVIOCITOS REUMATOIDES	104
7. IDENTIFICACIÓN DE GENES REGULADOS DIFERENCIALMENTE MEDIANTE MICROARRAYS DE EXPRESIÓN GÉNICA	106
8. EXPERIMENTOS DE VALIDACIÓN MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL	110
9. EFECTO DE ATRA EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA DE LOS SINOVIOCITOS REUMATOIDES.	113
10. LA REDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VCAM1, PTX3, CX3CL1 CONTRIBUYE A LA REGULACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE LOS SINOVIOCITOS REUMATOIDES INDUCIDA POR ATRA	114
11. LA AUSENCIA DE <i>CRABP2</i> NO PROTEGE DE LA ARTRITIS EXPERIMENTAL EN EL MODELO MURINO POR TRANSFERENCIA DE SUERO K/BxN	116
12. EL TRATAMIENTO CON ATRA AUMENTA LA SEVERIDAD DE LA ARTRITIS	119

<u>DISCUSIÓN</u>	<u>121</u>
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>137</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>143</u>





ABREVIATURAS



11c-RAL:	11 cis retinal	BID:	proteína agonista del dominio de la muerte que interactúa con BH3
9cRA:	9 cis ácido retinoico	Bmf:	factor modificador de Bcl-2
ACPAs:	Anticuerpos anti proteínas citrulinadas	c-Jun:	homólogo celular del protooncogen Jun.
ACR:	Colegio Americano de Reumatología	c-Myc:	homólogo celular del oncogén mielocitomasos.
ADHS:	Alcohol deshidrogenasas	cADN:	ADN complementario
ADN:	Ácido desoxirribonucleico	CC:	Licencia Creative Commons
AIF:	factor inductor de apoptosis	CEBPA:	CCAAT-enhancer binding protein family
ALDH:	Aldehído deshidrogenasas	CEH:	células estrelladas del hígado
anti-CarP:	anti proteínas carbamiladas	Cél B:	Células B
AP-1:	proteína activadora del factor de transcripción	Cél T:	Células T
APC:	Célula Presentadora de Antígeno	Células T_H:	células T colaboradoras
APL:	Leucemia Promielocítica Aguda	CIMUS:	Centro de Investigación de Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas de la Universidad de Santiago de Compostela
AR:	Artritis Reumatoide	CMH:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
ARN:	Ácido ribonucleico	COX-2:	ciclooxigenasa 2
ARNm:	ARN mensajero	CRABP2:	Proteína celular de unión al ácido retinoico
ASK1:	quinasa reguladora de la señal de apoptosis	CRALBP:	proteína celular de unión al retinaldehído
ATF:	factor activador de la transcripción	CRBP1:	proteínas transportadoras de unión específicas a retinoides tipo 1
ATRA:	Ácido transretinoico	CRBP2:	proteínas transportadoras de unión específicas a retinoides tipo 2
BAD:	la proteína promotora de muerte asociada a Bcl-2		
BAK:	proteína antagonista asesina homóloga de Bcl-2		
BAX:	proteína X asociada a Bcl-2		
Bcl-2:	protoncogen linfoma de células B		
Bcl-XL:	linfoma de células B extralargo		
BCO1:	enzima β , β -caroteno-15,15-dioxigenasa		

DAMPs:	señales de peligro de células dañadas o muertas	FAME:	fármacos modificadores de la enfermedad
DC:	daño del cartílago	FAMEb:	FAME biológicos
DeR3:	receptor señuelo 3	FAMEsc:	FAME sintéticos convencionales
DCs:	células dendríticas	FAMEsd:	FAME sintéticos dirigidos
DED:	dominio efector de muerte	FasL:	ligando de Fas
DGAT1:	diacilglicerol O-aciltransferasa 1	FBS:	suero fetal bovino
DISC:	complejo de señalización inductor de muerte	Fc:	fracción constante
DLK:	quinasa de doble cremallera de leucina.	FGF:	factor de crecimiento de fibroblastos
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>	FLICE:	enzima convertidora de IL-1 β tipo FADD
DMSO:	dimetilsulfóxido	FLIP:	inhibidor proteico de FLICE
EDTA:	ácido etilaminotetraacético	FLIP:	proteína inhibidora de FLICE
EGF:	factor de crecimiento epidérmico	FLS:	Sinoviocitos Tipo Fibroblasto
EGFR:	receptor del factor de crecimiento epidérmico	Fox:	familia Forkhead
ELISA:	ensayo de inmuoadsorción ligado a enzimas	FR:	Factor Reumatoide
Elk:	factor de transcripción tipo Ets	GEF:	factor de intercambio de nucleótidos de guanina
EO:	erosión ósea	GM-CSF:	factor de estimulación de colonias de granulocitos y monocitos
ER:	retículo endoplasmático	GPI:	glucosa 6 fosfato isomerasa
ERK:	quinasa regulada por señal extracelular	H&E:	Hematoxilina y eosina
ESM:	error estándar de la media	HLA:	Human Leukocyte Antigen
EULAR:	Liga Europea contra las enfermedades reumáticas.	HPK:	quinasa hematopoyética progenitora
FABP5:	Proteína celular de unión a ácidos grasos	iBALT:	tejido linfoide inducible asociado a bronquios
FADD:	dominio de muerte asociado a Fas	ICAM:	moléculas de adhesión intercelulares
FAK:	quinasa de adhesión focal	IFN:	interferón
		Ig:	inmunoglobulina

IGFBP-2:	proteína de unión tipo 2 al factor de crecimiento parecido a la insulina	MEKK:	quinasa de MAPKK
IL-1Ra:	Interleuquina 1 receptor antagonista	mFasL:	Fas ligando de membrana
IL:	interleuquinas	miARN:	microARN
iLBPs:	proteínas específicas de unión a lípidos intracelular	MKK:	quinasa de MAPK
ILK:	quinasa ligada a integrinas	MLK:	quinasa de linaje mixta
IRFs:	factores reguladores del interferón	MMPs:	metaloproteinasas de matriz
IS:	inflamación sinovial	MNK:	quinasa de interacción con MAPK
JAK:	Janus quinasas	MP:	socio MAPK
JIP:	proteínas de interacción con JNK	MSK:	proteína quinasa activada por estrés y mitógenos
JNK:	quinasa N-terminal de c-Jun	MTX:	metotrexato
KSR:	quinasa supresora de Ras	NF-κB:	factor nuclear κB
LOX4:	lisil oxidasa homóloga 4	NK:	natural killers
LPS:	lipopolisacárido	NOD:	ratón diabético no obeso
LRAT:	lecitin-retinol aciltransferasa	NT:	no transfectado
LYP:	linfoide tirosina fosfatasa	OA FLS:	sinoviocitos tipo fibroblasto de artrosis
M-CSF:	factor estimulador de colonias de macrófagos	PAD:	proteína-arginina-deiminasa
MAPKK:	quinasa de MAPK	PAMPs:	patrones moleculares asociados a patógenos
MAPKKK:	quinasa de MAPKK	PARP:	poly-ADP-ribosa-polimerasa
MAPKs:	proteínas quinasas activadas por mitógeno	Pb:	pares de bases
MCL-1:	secuencia de leucemia de células mieloides 1	PBS:	tampón fosfato salino
MCP-1:	proteína quimioatrayente de monocitos	PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
MEF2c:	factor potenciador específico de miocito tipo 2C	PEG2:	prostaglandina E2
MEK:	quinasa de MAPK	PI3K/Akt:	fosfoinositol 3-quinasas/proteína quinasa B
		PTPN22:	Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor Type 22 gene
		PTX3:	Pentraxina 3
		RA:	Ácido retinoico

Raf:	fibrosarcoma rápidamente acelerado	Sos:	proteína Son of sevenless
RAL:	todo-trans-retinaldehído	SPF:	sala libre de gérmenes patógenos
RANKL:	ligando del factor activador para NF-κB	STAT:	transductor de señal y activador de la transcripción
RAR:	receptores del ácido retinoico	STRA6:	receptor estimulado por ácido retinoico
RBP:	proteínas de unión a retinol	SUMO:	small ubiquitin-like modifier
REHs:	hidrolasas de ésteres de retinilo	Syk:	quinasas tirosinas del bazo
REs:	Ésteres de retinilo	T-bet:	T-box expresado en células T
RESs:	retinil esterases	TAE:	Tris- Ácido acético- EDTA
Rho:	homólogo de la GTPasa Ras	TAK:	quinasa activada por TGFβ
ROL:	retinol	tBID:	BID truncado
ROS:	especie de oxígeno reactivo	TBX21:	factor de transcripción T-box 21
RPE65:	isomerasa retinoide	TCR:	receptor de células T
RSK:	quinasa S6 ribosomal p90	TG:	transglutaminasa
RXR:	receptores X del retinoide	TIMP-1:	proteína de tejido inhibidora de MMPs
SAPK:	quinasas activadas por estrés	TLRs:	receptores tipo Toll
SCARB1:	receptores Scavenger de clase B tipo 1	TNF:	factor de necrosis tumoral
SCID:	inmunodeficiencia severa combinada	TRAIL:	ligando inductor de la apoptosis relacionada con TNF
Scr:	proteína tirosina quinasa del Sarcoma de Rous	TTR:	transtiretina
SDF-1/CXCL12:	factor 1 derivado de células estromales	UV:	ultravioleta
SDRs:	deshidrogenasas/reductasas de cadena corta	VCAM1:	proteína 1 de adhesión de células vasculares
SE:	epítipo compartido	VEGF:	factor de crecimiento endotelial vascular
SEM:	error estándar de la media	βC:	beta-caroteno
sFasL:	Fas ligando soluble		
siARN:	ARN de interferencia		
SNP:	polimorfismo de un sólo nucleótido		



INTRODUCCIÓN



A. ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, inflamatoria y sistémica, caracterizada por la inflamación crónica de las articulaciones periféricas, con una distribución simétrica. Suele cursar con dolor, edema, rigidez y en ocasiones, destrucción progresiva del cartílago y hueso, que lleva a la incapacidad funcional¹. Se asocia con complicaciones sistémicas y reducción de la esperanza de vida. La AR es la artritis inflamatoria más común, afectando alrededor del 0,5-1%² de la población mundial. Es más frecuente en mujeres, con un ratio de tres a uno con respecto a los hombres. Aunque puede debutar a cualquier edad, aparece con más frecuencia, entre los 40 y los 60 años de vida.

Las manifestaciones clínicas en el inicio de la enfermedad son generales e inespecíficas, siendo muy difícil su diagnóstico. El paciente típico presenta articulaciones dolorosas e inflamadas, de aparición reciente y rigidez articular matutina. La clínica específica aparece de forma gradual, con afectación poliarticular y simétrica, siendo las articulaciones del carpo, las metacarpofalángicas y las interfalángicas proximales las más afectadas. El signo característico de la AR es la tenosinovitis de tendones flexores, lo cual hace que disminuya el arco de movimiento y que los dedos adquieran posturas de contractura. Actualmente, con los tratamientos disponibles es muy difícil que se llegue a ese grado de afectación clínica, aunque la destrucción progresiva de las articulaciones y las partes blandas sí puede ocasionar deformidades crónicas e irreversibles, que finalmente conduzcan a la incapacidad funcional^{2,3}.

Como es una enfermedad sistémica, en la AR pueden aparecer diversas manifestaciones extraarticulares, como fatiga, nódulos subcutáneos, afectación pulmonar, pericarditis, neuropatía periférica, vasculitis y alteraciones hematológicas (Figura 1).

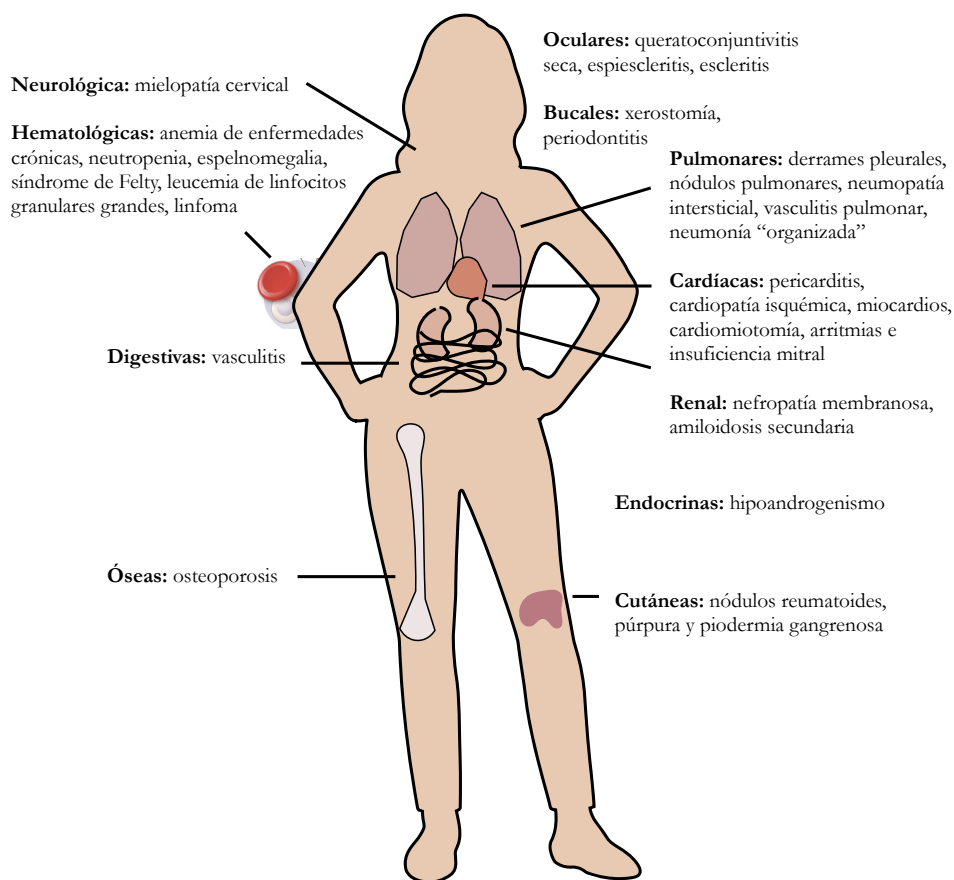


Figura 1. Esquema representativo de las manifestaciones extraarticulares más habituales en la AR. Imagen de autoría propia.

1. Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico de la AR ha sido siempre complicado. Es probable que haya estado presente como una enfermedad durante mucho tiempo, aproximadamente desde el siglo XVII, pero en la nomenclatura se habría confundido con términos como gota reumática, reumatismo crónico, reumalgia, reumatismo escorbútico, etc. Fue en 1800, cuando Londré Beauvais describió casos patológicos típicos, identificando la enfermedad como una entidad

separada. El nombre actual se presentó por primera vez en el tratado de 1859 escrito por Alfred Baring Garrod⁴.

Los primeros criterios de clasificación se definieron en 1987 por el Colegio Americano de Reumatología (ACR)⁵, lo que supuso un gran avance en el diagnóstico de la enfermedad. No obstante, estos criterios estaban limitados por la escasa sensibilidad y especificidad para clasificar como AR a los pacientes con artritis inflamatoria temprana. La detección temprana de la enfermedad es de vital importancia, ya que el tratamiento eficaz en la artritis de reciente comienzo evita o retrasa la progresión de la misma⁶. Así pues, en 2010 se presentaron nuevos criterios de clasificación de la AR para eliminar las deficiencias de los antiguos^{2,7}. Los nuevos criterios de clasificación de la AR son los siguientes⁸:

- Presentar al menos 1 articulación con sinovitis clínica (al menos una articulación inflamada) y que dicha sinovitis no pueda ser explicada por otra enfermedad.

- Sumar un total igual o superior a 6 en el sistema de puntuación que se presenta en la tabla 1. Este sistema considera la distribución de la afectación articular, la serología positiva del factor reumatoide (FR) y/o anticuerpos anti proteínas citrulinadas (ACPAs), aumento de los reactantes de fase aguda y la duración igual o superior a 6 semanas.

Estos criterios también permiten diagnosticar a aquellos pacientes que presenten una AR evolucionada siempre que tengan erosiones típicas de AR.

Tabla 1. Conjunto de variables y puntuación de cada una de las variables para el cómputo global. Un paciente será clasificado de AR si la suma total es igual o superior a 6.
Tabla adaptada de Gómez⁸.

VARIABLES	PUNTUACIÓN
AFECTACIÓN ARTICULAR	
1 articulación grande afectada	0
2-10 articulaciones grandes afectadas	1
1-3 articulaciones pequeñas afectadas	2
4-10 articulaciones pequeñas afectadas	3
> 10 articulaciones pequeñas afectadas	5
SEROLOGÍA	
FR y ACPA negativos	0
FR y/o ACPA positivo bajos (<3 VN)	2
FR y/o ACPA positivo alto >3 VN)	3
Reactantes de fase aguda	
VSG y PCR normales	0
VSG y/o PCR elevadas	1
DURACIÓN	
< 6 semanas	0
> 6 semanas	1

2. Epidemiología

La incidencia de la AR se encuentra entre el 0,5-1%² de la población adulta mundial. Esta frecuencia tiene una reducción aparente de norte a sur (en el hemisferio norte) y desde las zonas urbanas a las áreas rurales². Asimismo, existen algunas excepciones interesantes que demuestran que la prevalencia e incidencia

de la AR varía en función de la localización geográfica o del grupo étnico, lo que apunta hacia un papel genético y ambiental en el riesgo de desarrollo de la AR (Figura 2). Por ejemplo, poblaciones de tribus nativas estadounidenses alcanzan las máximas incidencias de AR, con una prevalencia del 5,3% en los indios Pima y de un 6,8% para los Chippewa. Por el contrario, existen grupos en zonas rurales de Sudáfrica y Nigeria donde no se ha podido encontrar ningún caso de AR, en estudios de 500 y 2000 adultos, respectivamente. También aparecen incidencias muy bajas en poblaciones del sudeste asiático, incluyendo China y Japón (0,2-0,3%)^{3,9}. En España la incidencia de la AR se ha establecido entre un 0,2 y un 0,8%³.

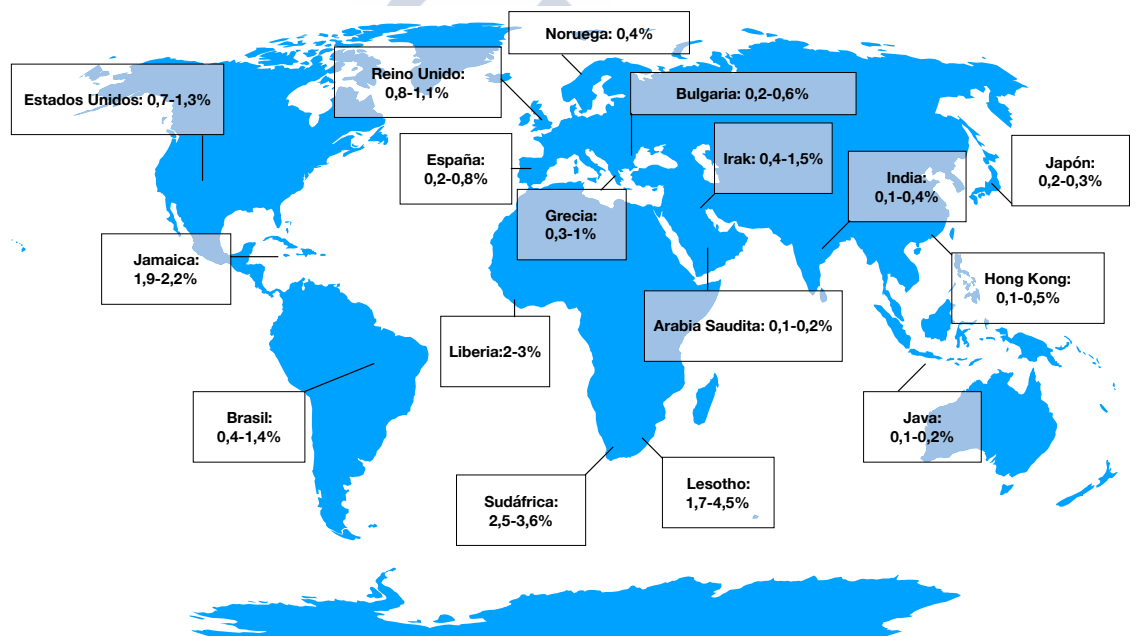


Figura 2. Tasas de prevalencia de la AR a nivel mundial. Imagen de autoría propia.

3. Etiología

La AR es una enfermedad compleja en la que están implicados numerosos factores genéticos, epigenéticos y ambientales. De forma general, la AR ocurre en individuos genéticamente predispuestos, sometidos a unas determinadas condiciones ambientales¹⁰.

3.1. Factores genéticos

Estudios en gemelos han implicado a los factores genéticos en la AR, con una tasa de concordancia de la enfermedad del 15 al 30% entre gemelos monocigóticos y del 5% entre gemelos dicigóticos¹¹.

Los factores de riesgo genético más importantes, y los primeros que se encontraron asociados con la enfermedad, son los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), también conocidos como genes del antígeno leucocitario humano (HLA)¹⁰. Se encuentran en el brazo corto del cromosoma 6 y se subdividen en tres clases: clase I, II y III. Todas las clases codifican para moléculas que participan en la activación de la respuesta inmune¹². Los genes de clase I y II codifican para glicoproteínas de la membrana plasmática, las cuales están involucradas en los mecanismos de presentación y procesamiento de antígenos a los linfocitos T. Los genes de la clase III codifican para citoquinas y proteínas del sistema del complemento. No obstante, no todos los genes presentan el mismo riesgo genético, el gen más importante de susceptibilidad a la AR está ligado a un subtipo de la clase II. La clase II está compuesta por al menos 14 genes distintos, que se estructuran en los loci DR, DQ o DP. El locus DR es el encargado de la codificación genética para el reconocimiento de antígenos. Determinados alelos de este locus, HLA-DRB, son los que contribuyen mayoritariamente al riesgo de padecer AR: HLADRB1*0101, HLADRB1*0102, HLADRB1*0401, HLADRB1*0404, HLADRB1*0405,

HLADRB1*0408, HLADRB1*0410, HLADRB1*1001 y HLADRB1*1402¹⁰. Aunque se trata del riesgo genético más importante, su implicación en la patogenia de la enfermedad aún no está clara. La primera prueba circunstancial de la patogenicidad del HLA en la AR fue el hallazgo de una secuencia aminoacídica conservada en todos los alelos DR, a la que se le denominó epítipo compartido (SE). Su presencia sugiere que las moléculas que lo contienen pueden unirse al mismo antígeno, inducir alteraciones en las interacciones células T-antígeno y/o modificar el repertorio de células T que participan en respuestas inmunitarias adaptativas más amplias. Además, la asociación genética entre el SE y la AR está fuertemente relacionada con la expresión de ACPAs, implicados en la patogenia de la enfermedad. Esta asociación se atribuye parcialmente a que los antígenos citrulinados son preferentemente presentados a las células T por moléculas HLA-DRB1, ya que, en la región de unión del péptido, el bolsillo P4 de los HLA DR, se encuentra cargado positivamente y favorece la unión de las variantes citrulinadas del péptido antes que de aquellos péptidos que presentan arginina¹³. Los pacientes que presentan SE y ACPAs presentan un mayor daño y progresión de la enfermedad¹⁰.

La asociación del HLA en pacientes seropositivos se ha estimado del 12,7%, por lo que, si la heredabilidad fuese del 50%, sólo explicaría el 25,4%¹⁴. La búsqueda de otros alelos de riesgo ha hecho que en la última década se identificaran más de 101 loci asociados al desarrollo de la AR. A pesar del avance que esto supone, hay que señalar que el riesgo asociado a cada uno de estos genes es muy bajo¹⁴. De entre ellos, el polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) en el gen de la proteína tirosina fosfatasa, no receptor, tipo 22 (PTPN22), es el factor genético de riesgo más importante para el desarrollo de la AR fuera de los genes CMH¹⁵. PTPN22 codifica para la proteína linfocítica tirosina fosfatasa (LYP), reguladora negativa de la activación de células T y el alelo asociado a la enfermedad produce una ganancia de función de LYP¹⁶. Otras variantes menos

importantes implican el funcionamiento de las células T y B, proteínas de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y otras citoquinas proinflamatorias, el factor transductor de señal y activador de la transcripción (STAT), el factor nuclear κ B (NF- κ B) y los componentes del complemento¹⁰. No obstante, de la mayor parte de los loci asociados, no se conoce su función.

Además de los factores genéticos, existen otros como los cambios epigenéticos y ambientales, que aportan una contribución mayor al desarrollo de la enfermedad.

3.2. Factores epigenéticos

Los procesos epigenéticos regulan patrones de expresión de genes, sin la alteración de las secuencias del ácido desoxirribonucleico (ADN)¹⁷. Uno de los mecanismos epigenéticos mejor conocidos es la metilación del ADN, basada en la adición de grupos metilos al carbono 5 del nucleótido citosina, formando la 5-metilcitosina. Este proceso ocurre normalmente en un contexto dinucleótido CpG (es decir, donde una citosina es seguida por una guanina), principalmente, en regiones reguladoras o genes promotores. La unión de factores de transcripción a estas regiones metiladas es más complicada, por lo que la metilación del ADN va ligada, generalmente, a una represión de la transcripción génica¹⁸. Los estudios en pacientes con AR han mostrado cambios en el patrón de metilación que estarían implicados en el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, se ha observado disminución de la metilación en células T periféricas¹⁹, expresión alterada de las enzimas de metilación²⁰ o diferencias en metiloma del tejido sinovial de pacientes²¹, en pacientes con AR en comparación con controles sanos.

Otro mecanismo importante en la regulación transcripcional epigenética es la modificación de las histonas. Estas proteínas estructurales se encargan del empaquetamiento del ADN en los nucleosomas, unidad básica de la cromatina,

con el fin de acomodarlo en el núcleo. Para permitir la unión de los factores de transcripción, es necesario que las histonas liberen a la molécula de ADN, descompactándolo. Así pues, la capacidad de unión de las histonas, regula en cierta manera, la expresión génica, permitiendo o no, la unión de los factores de transcripción. Los cambios que sufren las histonas por metilación, acetilación, fosforilación, sumoilación o citrulinación, afectan a su capacidad de unión al ADN¹⁸. Así por ejemplo, la acetilación de histonas, reduce la capacidad de las mismas de unirse al ADN, y con ello incrementa la accesibilidad de factores de transcripción a genes promotores promoviendo la expresión génica. Distintas evidencias, sugieren que la deacetilación de histonas puede tener un papel importante en la artritis. La inhibición de deacetilasas de histonas atenúa la patogenia de la enfermedad en diferentes modelos animales, mediante la reducción de la sinovitis y de la destrucción ósea y de cartílago²²⁻²⁴. Por otro lado, experimentos *in vitro* mostraron que la inhibición de deacetilasas reduce la expresión de IL-6 tanto en macrófagos como en sinoviocitos tipo fibroblasto (FLS) de pacientes con AR²⁵. Además en FLS se observó que los niveles de histona deacetilasa se encuentran incrementados en pacientes con AR²⁶.

Los mecanismos comentados anteriormente, actúan a nivel de ADN, regulando la transcripción génica. Además, otro de los procesos epigenéticos mejor comprendidos es la regulación de los transcritos del ácido ribonucleico (ARN) mediante la presencia de microARN (miARN). Los miARN son fragmentos de 22 nucleótidos de longitud, de media, no codificantes, complementarios a secuencias codificantes de ARN mensajero (ARNm). Estos miARN interaccionan con los ARNm promoviendo su degradación o impidiendo su traducción a proteína por los ribosomas¹⁸. Distintos estudios indican que la expresión de miARNs específicos en la sinovia de pacientes con AR exacerban los mecanismos de inflamación y autoinmunidad. Por ejemplo, el miARN-155 y el 203 regulan la producción de citoquinas y proteasas en FLS de

pacientes con AR^{27,28}. Otro ejemplo son los miARN-124a y 34a que regulan el crecimiento sinovial y la apoptosis en FLS de pacientes cultivados *in vitro*^{29,30}.

3.3. Factores ambientales

Los principales factores ambientales implicados en el desarrollo de la AR están relacionados con la pérdida de tolerancia del sistema inmune, característica de las enfermedades autoinmunes.

El sistema inmune innato está equipado con receptores capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y señales de peligro de células dañadas o muertas (DAMPs). Gracias al reconocimiento de estas señales, el organismo distingue entre lo propio y lo exógeno y es capaz de activar la respuesta inmune innata hacia patógenos y tumores. La activación repetida de los receptores de reconocimiento de patrón (PPR) puede provocar fallos y llevar al ataque de proteínas endógenas, promoviendo el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, la activación repetida de un tipo de PPR, los receptores tipo Toll (TLRs), en un contexto genético o epigenético apropiado, se asocia con la predisposición de enfermedades autoinmunes, como enfermedad de Crohn, diabetes tipo 1 o AR³¹. El mecanismo patogénico de los TLRs en la AR es aún desconocido, pero su expresión se ha visto incrementada en la sinovia de pacientes con AR, predominantemente del TLR2 y TLR4¹⁰. La hipótesis que se baraja es que la estimulación de TLRs por agentes nocivos, promueve la maduración de células dendríticas, la producción de citoquinas promotoras de células T y el desarrollo de células B autorreactivas³¹.

Por otro lado, también se ha asociado la activación de los TLRs con el aumento de expresión de enzimas proteína-arginina-deiminasa (PAD). Estas enzimas son las encargadas del proceso de citrulinación de proteínas, basado en el cambio del aminoácido arginina a citrulina. Esta modificación postraducciona

convierte las proteínas en neoantígenos, produciendo una respuesta inmune que lleva ligada la producción de ACPAs. Las enzimas responsables, concretamente PAD2 y PAD4, se han encontrado en el líquido y tejido sinovial de pacientes con AR³². Además anticuerpos anti-PAD4 se han visto asociados con los ACPAs incluso hasta cuatro años antes del desarrollo clínico de la AR³³.

Como se ha comentado, determinados agentes nocivos inducen la respuesta del sistema inmune innato mediante la activación de los TLRs en los pulmones. Entre estos factores ambientales perjudiciales, se encuentra el tabaco, las partículas de sílice, el polvo textil o el microbioma. El mejor caracterizado como factor nocivo de susceptibilidad a AR es el tabaco. Fue descrito en 1987, y su asociación con la artritis parece ser dependiente de la duración y el consumo del mismo. A pesar de la teoría que propone al tabaco como inductor de la respuesta inmune y generación de ACPAs, esto no concuerda con el porcentaje de pacientes seropositivos que no han mostrado evidencias de inflamación pulmonar o de exposición a agentes respiratorios nocivos. Posteriormente, se implicó el microbioma en la generación de ACPAs, aunque sigue siendo un tema controvertido. El mecanismo sugerido es la inmunidad hacia *Porphyromonas gingivalis*, una bacteria causante de periodontitis, que contiene su propia PAD y proteínas citrulinadas¹³. Aunque datos epidemiológicos no han conseguido relacionar periodontitis con AR³⁴, la inmunidad hacia *P.gingivalis* está significativamente asociada con la presencia de ACPAs³⁵.

Además de los factores comentados, relacionados con la pérdida de tolerancia del sistema inmune, también se considera un factor ambiental asociado con el desarrollo de la AR, el sexo femenino. La incidencia de la AR es mayor en el sexo femenino, con una relación de tres mujeres por cada hombre. El mecanismo por el cual se trata de un factor de riesgo, no se conoce, aunque los investigadores apuntan a un papel potencial de las hormonas. Los cromosomas

sexuales también han sido postulados como factores implicados, y en el año 2012 se describió una asociación de un locus del cromosoma X con la AR¹⁷.

4. Patogenia de la artritis reumatoide

La patogenia de la AR es compleja y consta de dos fases bien diferenciadas. La primera etapa de la enfermedad se conoce como AR preclínica, fase en la que tiene lugar la interacción de los factores de riesgo genéticos y ambientales, para iniciar y propagar el desarrollo de autoinmunidad¹³. Los factores implicados en la pérdida de tolerancia del sistema inmune, comentados en el apartado anterior, se resumen en la figura 3.

Esta fase preclínica se caracteriza por el desarrollo de una respuesta autoinmune, con la producción de autoanticuerpos. El FR fue el primer autoanticuerpo asociado con la AR, no obstante, su presencia no es específica de esta enfermedad. Aparece también en el contexto de muchas otras condiciones inflamatorias, particularmente, en las respuestas inmunes mediadas por células T a complejos inmunes que contienen IgG¹³. A pesar de su baja especificidad, sí tiene un papel en la patogenia de la AR, ya que es un anticuerpo que se une a la fracción constante de las Ig y contribuye a la formación de inmunocomplejos, lo que activa el complemento y potencia el efecto en la respuesta inflamatoria mediante citoquinas^{2,10,36}. Por otro lado, los autoanticuerpos mejor asociados con la enfermedad son los ACPAs, que se detectan hasta diez años antes de la presencia de signos y síntomas clínicos de lesión tisular; además, son muy específicos de la enfermedad. No obstante, a pesar de su especificidad, existe entre un 20-30% de pacientes seronegativos¹⁰, por lo que actualmente se estudia si existen otros autoanticuerpos frente a distintas modificaciones postraduccionales. Así, se han descubierto anticuerpos anti-proteínas carbamiladas (anti-CarP) que reconocen antígenos homocitrulinados generados

por carbamilación, y que se encuentran entre un 35,6-45% de los pacientes ACPA-positivos y entre un 4 a un 8% de ACPA-negativos³⁷⁻⁴⁰. En este escenario, es probable que emerjan nuevos autoanticuerpos frente a antígenos metilados, fosforilados, sumoílados y ubiquitinados^{2,10}.

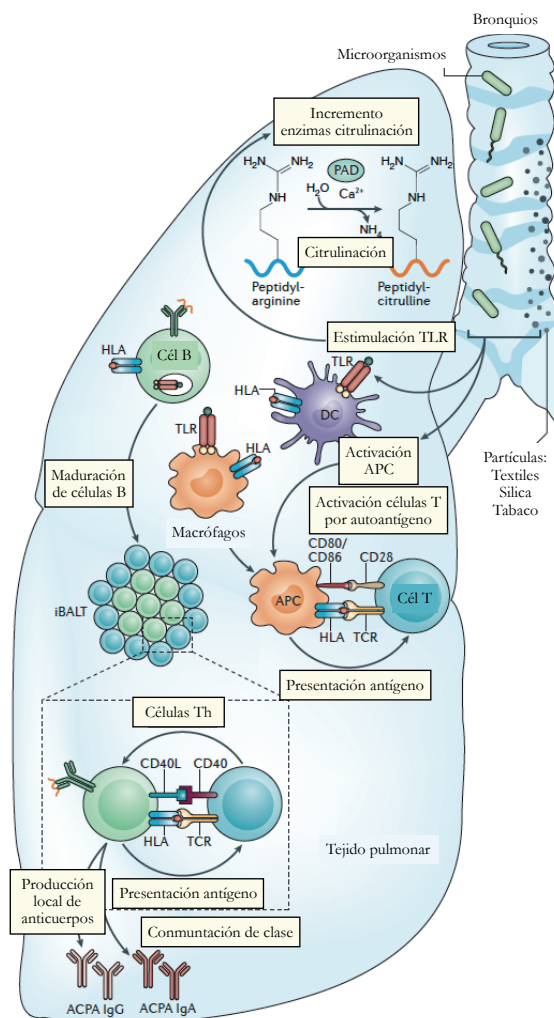


Figura 3. Esquema representativo de la activación local del sistema inmune en los pulmones. Los TLRs son estimulados repetidamente, por agentes nocivos, como el tabaco o agentes infecciosos. Los TLRs activan a las células del sistema inmune que reaccionan frente a proteínas endógenas. Los autoantígenos más comunes son proteínas citrulinadas, formadas por la acción de las enzimas PAD. Como consecuencia se producen anticuerpos antiproteínas citrulinadas, ACPAs. Las abreviaturas utilizadas en el esquema son: ACPA, autoanticuerpos antiproteínas citrulinadas; APC, células presentadoras de antígeno; Cél B, células B; Cél T, células T; DC, células dendríticas; HLA, antígeno de histocompatibilidad; iBALT, tejido linfoide inducible asociado a bronquios; Ig, inmunoglobulina; PAD, proteína arginina-deiminasa; TCR, receptor de células T; TLR, receptor tipo Toll. Imagen adaptada de Malmström y col¹³, permitido por Springer Nature.

Durante esta fase preclínica, es importante la implicación de las células B y T, que proporcionan un ambiente permisivo para la autoinmunidad en la AR. Los factores genéticos que se comentaron anteriormente son los principales responsables de ese entorno propicio. Así pues, la presencia de las variantes HLA-DR con SE, favorece la presentación de ciertos péptidos citrulinados, antes que aquellos que poseen arginina, lo que induce una inmunidad específica hacia estos neoantígenos por parte de los linfocitos T. Por otro lado, el alelo de riesgo para el gen PTPN22 promueve un repertorio de células T generalmente más amplio, permitiendo la aparición de células T autoreactivas. Estas células T-CD4⁺ (dependientes del HLA de clase II), ayudan a células B reactivas en la producción de anticuerpos y en la migración hacia las articulaciones y proliferación en las mismas^{2,10,13}.

La segunda etapa de la enfermedad es la fase efectora, caracterizada por la aparición de las manifestaciones clínicas. Tras la pérdida de tolerancia, las células del sistema inmune activadas, así como los ACPAs o complejos inmunes formados por la interacción con el FR, se infiltran en el torrente sanguíneo y se dirigen al compartimento sinovial. Actualmente, todavía se desconoce por qué las articulaciones son la diana del sistema inmune activado. El compartimento sinovial, se llena de células inmunes innatas (monocitos, células dendríticas, mastocitos y células linfoides innatas) y ACPAs desencadenando la activación del complemento y la acción de los macrofagos^{2,10,36}. Se liberan enzimas que degradan el colágeno, los proteoglicanos y otras moléculas de matriz, creando neoepítomos. Las células dendríticas engullen las proteínas degradadas y se las presentan a células T en los ganglios linfáticos, lo que inicia la migración de células inmunes adaptativas (Th1, Th17, células B, plasmoblastos y plasmocitos) hacia la articulación. La respuesta inmune que se produce en la AR es compleja y aún no se conoce el mecanismo con exactitud. No obstante, parece estar claro que la patogenia de la AR implica la activación del sistema inmune innato y

adquirido, y que produce una cascada inflamatoria mediada por la liberación de citoquinas por distintos tipos celulares. Las citoquinas conforman un grupo diverso de proteínas, entre las que se incluyen monoquinas, linfoquinas, interleuquinas (IL), interferón (IFN), factores estimuladores de colonias y quimioquinas^{41,42}. Actúan a través de receptores de distintas familias, desencadenando cascadas de señalización intracelular que alteran la expresión génica. De este modo, median interacciones complejas entre células, regulando diversos procesos biológicos⁴¹. En el suero de pacientes con AR, se encuentran incrementadas un amplio número de citoquinas, pero las más importantes son TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-8.

TNF es una potente citoquina que regula la producción de otras citoquinas proinflamatorias. Lo secretan principalmente los macrófagos activados, aunque también lo expresan neutrófilos, células Natural Killers (NK), células endoteliales, linfocitos activados, FLS, osteoblastos y osteoclastos⁴³. TNF lleva a cabo funciones pleiotrópicas mediante la señalización a través de sus dos receptores, TNFR1 (p55) y TNFR2 (p75). Mientras que TNFR1 se expresa en todos los tipos celulares, TNFR2 es más restrictivo y sólo aparece en células inmunes y endoteliales⁴³. Ambos receptores pueden ser eliminados enzimáticamente de la superficie de las células y, una vez en los fluidos corporales, ambos pueden unirse a TNF y neutralizar su actividad biológica. Por lo tanto, los receptores actúan como inhibidores naturales de TNF⁴⁴. Esta citoquina es el promotor de diversos procesos patológicos característicos de la AR. Activa de forma aberrante a osteoclastos, lo que conduce a una mayor reabsorción ósea. Además, promueve otros procesos implicados en la destrucción articular, como la secreción de metaloproteasas de matriz (MMPs) por los FLS y el incremento de la expresión de moléculas de adhesión intercelulares (ICAM). Por otro lado promueve la formación del *pannus* mediante la activación de células endoteliales, sinoviocitos reumatoides y la amplificación

de quimioquinas implicadas en favorecer el crecimiento celular. También se encuentra involucrado en la inducción de fiebre, por la síntesis de prostaglandina E2 (PEG2) y la sensibilización del nociceptor, el cual incrementa el dolor^{41,42}. La implicación en estos procesos, hace de TNF un mediador inflamatorio muy importante en la AR.

La citoquina IL-1 β también es de gran importancia en la patogenia de la AR. Se secreta mayoritariamente por monocitos y macrófagos; y lleva a cabo sus funciones a través de su receptor IL-1RI, porque aunque existe otro receptor, IL-1RII, este no transduce la señal, sino que actúa como un receptor señuelo. Al igual que ocurría con los receptores de TNF, los de IL-1 β pueden escindirse enzimáticamente y actuar como inhibidores⁴⁴. Otro inhibidor natural es el receptor antagonista de IL-1 β (IL-1Ra), que limita la acción de IL-1 β . En la AR, el balance entre IL-1 β /IL-1Ra está desregulado⁴¹, viéndose aumentada la acción de IL-1 β . IL-1 β realiza funciones patogénicas compartidas con TNF, pero además, es capaz de promover la activación de células T e inducir la síntesis de otras proteínas proinflamatorias, aunque no de TNF. Cabe destacar que esta citoquina tiene un papel más potente que TNF en la destrucción del cartílago.

Por otro lado, otra citoquina implicada es IL-6, la cual se encuentra elevada en líquido sinovial, lo que también se correlaciona con destrucción articular. Producida por macrófagos activados y FLS, esta citoquina muestra funciones controvertidas. Principalmente, es una molécula proinflamatoria, que induce la expresión de quimioquinas en células endoteliales (principalmente proteínas quimioatrayentes de monocitos (MCPs): CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-2, CXCL5/ENA-78 y CXCL6/GCP-2), activa linfocitos T y B y osteoclastos. No obstante, bajo determinadas circunstancias, puede exhibir propiedades antiinflamatorias, mediante la inducción de producción de IL-1Ra y supresión de la expresión de IL-1 β , TNF e IL-12^{41,44}.

Otra interleuquina importante en la patogenia de la AR es IL-8, producida en el compartimento sinovial, por sinoviocitos tipo fibroblasto y tipo macrófago⁴⁵. Sus funciones son la quimioatracción de linfocitos y neutrófilos y la mediación de la angiogénesis⁴⁶. Además, recientemente se ha descubierto que IL-8 media la activación de osteoclastos, tras la unión de ACPAs a estas células⁴⁷.

Aunque las principales moléculas proinflamatorias y dianas de los tratamientos biológicos actuales son las comentadas anteriormente, no hay que olvidar otras citoquinas cuya desregulación, perpetúa la inflamación. Por ejemplo, dentro de las proinflamatorias existen las interleuquinas IL-12, IL-18, IL-15 e IL-17 y dentro de las antiinflamatorias encontramos IL-4, IL-10, TGF e IL-13⁴¹.

Como consecuencia de la elevación de los niveles de citoquinas, se crea un microambiente inflamatorio que desencadena la transformación de las células que conforman la membrana sinovial, los FLS, a un fenotipo agresivo. Entre las características de este nuevo fenotipo, está el crecimiento descontrolado y la resistencia de las células a la apoptosis. De este modo, la sinovia, que normalmente consta de una monocapa de células, sufre una hiperplasia y se transforma en un tejido inflamatorio, característico de la enfermedad, el *pannus*^{48,49}. El *pannus* es un tejido vascularizado compuesto de macrófagos, osteoclastos, FLS invasivos y linfocitos, el cual actúa a nivel local como un tumor invasivo y destructivo⁵⁰. Caracteriza la sinovia de pacientes con AR, y se ve reflejado en un edema articular, una de las primeras manifestaciones clínicas de la AR². Además, a su vez, los FLS secretan citoquinas que promueven un mayor crecimiento celular, perpetúan la inflamación, intervienen en la formación de vasos sanguíneos y promueven el reclutamiento y activación de más células inmunes, como neutrófilos, mastocitos, células dendríticas, macrófagos y linfocitos^{41,42,48,51}.

Por otro lado, los sinoviocitos reumatoides, adquieren capacidad de migración e invasión, que les permite adherirse al cartílago. De esta forma provocan su destrucción, por la liberación masiva de enzimas como MMPs, catepsinas y agrecanasas. Las más implicadas en la patogenia de la AR son MMPs, enzimas de la familia de endopeptidasas dependientes de Zinc, capaces de degradar moléculas de la matriz extracelular⁵². En la enfermedad, son especialmente importantes MMPs como las colagenasas (MMP-1 y MMP-13) y las estromielisinas (MMP-3)⁵⁰. Keyszer y col fueron los primeros en mostrar una correlación entre los niveles circulatorios de MMPs y las manifestaciones clínicas de la AR. En este mismo estudio, MMP-3 fue determinada como mejor predictor de la severidad de la enfermedad que los niveles de citoquinas⁵³. Además, Cunnane y col describieron que la erosión de la superficie articular está relacionada con los niveles de MMP-1 y MMP-3⁵⁴. El papel de MMPs ha sido analizado utilizando ratones deficientes para distintos modelos experimentales de artritis, y los resultados varían en función de la MMP analizada. El efecto de MMP-2 fue analizado en un modelo de inducción de la enfermedad por anticuerpo, mostrando una artritis exacerbada en los ratones deficientes en esta metaloproteasa, en comparación con el fenotipo salvaje⁵⁵. En ratones deficientes para MMP-8 en el modelo de transferencia de suero K/BxN, se observó un incremento de la inflamación y en la erosión ósea⁵⁶, por lo que se concluye que estas dos MMPs son protectoras frente a la sinovitis y la erosión ósea. En contraste, la ausencia de MMP-9 fue asociada con una reducción de la severidad de artritis, indicando la necesidad de esta MMP para el desarrollo de artritis⁵⁵. Además de la destrucción del cartílago, los sinoviocitos reumatoides, median la reabsorción ósea por la regulación de la maduración de los osteoclastos. Los FLS secretan el ligando del factor activador para NF- κ B (RANKL), que en presencia de TNF y del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) produce la activación de los osteoclastos¹. A este proceso contribuyen la infiltración de

ACPAs en la articulación, ya que como ya se ha comentado, la unión de ACPAs a los osteoclastos promueve su desarrollo y maduración mediante la secreción de IL-8⁴⁷.

5. Mecanismos moleculares

Las citoquinas, así como los factores de crecimiento o mecanismos de estrés son estímulos extracelulares a los que se ven sometidas las células. Estos estímulos desencadenan cascadas de señalización intracelular produciendo la alteración de la transcripción génica, mediante la activación o inhibición de los factores de transcripción. De este modo, median interacciones complejas entre células, regulando diversos procesos biológicos, como la inflamación, la proliferación, el estrés celular o la apoptosis. En la patogenia de la AR, estos estímulos están incrementados en la articulación y por tanto las vías de señalización también se encuentran alteradas^{57,58}.

5.1. Vías de señalización intracelular

La mayor parte de cascadas de señalización desencadenadas por la unión de un ligando se producen a través de proteínas quinasa. Las quinasas son proteínas capaces de añadir un grupo fosfato a otras proteínas diana. Esta proteína fosforilada se activa, y fosforila a su vez a otras proteínas diana. Así se crea un efecto dominó que lleva a la activación final de proteínas citoplasmáticas o nucleares, entre las que se incluyen factores de transducción, que regulan la expresión génica. Las principales rutas implicadas en la AR son la ruta de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs), las Janus quinasas (JAK), las quinasas tirosinas del bazo (Syk) y la ruta fosfoinositol 3 quinasa/ proteína quinasa B (PI3K/AKT)⁵⁸.

Proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs)

Las MAPKs comprenden una familia de quinasas serina/treonina que regulan procesos celulares importantes, entre los que se incluyen la proliferación, diferenciación, supervivencia/apoptosis celular, motilidad y senescencia. Por todo esto, no es sorprendente que la desregulación de estas enzimas proporcione el fondo molecular para enfermedades inflamatorias crónicas y cáncer.

Las MAPKs pueden clasificarse en tres grandes grupos: proteína quinasa regulada por señal extracelular (ERK), quinasa N-terminal del homólogo celular del protooncogen Jun, c-Jun (JNK) (también conocida como quinasas activadas por estrés [SAPK]) y p38. Estímulos como factores de crecimiento, mitógenos, citoquinas y señales de estrés, activan a estas MAPKs mediante una cascada de quinasas secuenciales, tal y como se muestra en la figura 4. La MAPK se activa por MAPK quinasa (llamadas MAPKK, MEK o MKK), y esta a su vez se activa por MAPKK quinasa (MAPKKK, MEKK o MKKK). Mientras que las MAPKKK fosforilan a las MAPKK en serina/treonina, las MAPKK activan a las MAPKs por fosforilación en un dominio conservado, treonina-X-tirosina (TXY), que en cada MAPK se caracteriza por distintos residuos X dentro de sus motivos de activación (ERK, -TEY-, JNK, -TPY- y p38, -TGY-)⁵⁸. La especificidad del sustrato de la MAPK dependerá de los sitios de unión al motivo de acoplamiento.

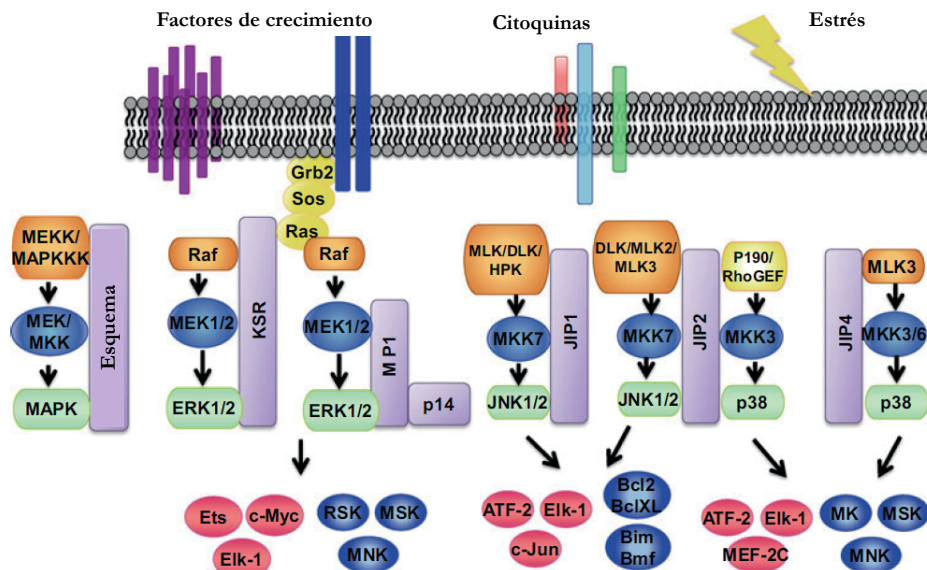


Figura 4. Cascada de activación de las MAPKs (ERK, JNK y p38). Factores de crecimiento, y el proto-oncogén Ras estimulan las MAPKKK, que incluyen miembros de las quinasas de la familia Raf, para fosforilar y activar MEK1 y MEK2, que a su vez median la activación de ERK1/2. Por el contrario, los estímulos de estrés o citoquinas activan JNK y p38 a través de MKK4/7 y MKK3/6 respectivamente, que a su vez son activados *upstream* por muchas MAPKKKs diferentes (MEKK1-4, DLK, MLK2, quinasa reguladora de la señal de apoptosis [ASK -1], quinasa activada por TGF- β [TAK]) dependiendo del estímulo. Las proteínas activadas por las MAPK pueden ser nucleares o citoplasmáticas, incluyendo factores de transcripción (mostrados en rosa) y otras moléculas transductoras de señal (en azul oscuro). Las MAPKKK aparecen en color naranja, las MAPKK en color azul y las MAPK en color verde. Las abreviaturas utilizadas son: ATF, factor activador de la transcripción; Bcl-2, protooncogen linfoma de células B 2; Bmf, factor modificador de Bcl-2; DLK, quinasa de doble cremallera de leucina; Elk, factor de transcripción tipo Ets; ERK, proteína quinasa regulada por señal extracelular; GEF, factor de intercambio de nucleótidos de guanina; Grb2, proteína de unión al receptor del factor de crecimiento; HPK, quinasa hematopoyética progenitora; c-Jun, homólogo celular del protooncogén Jun; JIP, proteínas de interacción con JNK; JNK, quinasa N-terminal de c-Jun; KSR, quinasa supresora de Ras; MAPK, proteínas quinasas activadas por mitógenos; MKK/MEK, MAPK quinasa; MAPKKK/MEKK, MAPKK quinasa; MEF2c, factor potenciador específico de miocito 2C; MLK, quinasa de linaje mixta; MNK, quinasa de interacción con MAPK; MP, socio MAPK; MSK, proteína quinasa activada por estrés y mitógenos; c-Myc, homólogo celular del oncogén mielocitomatosis; Raf, fibrosarcoma rápidamente acelerado; RSK, quinasa S6 ribosomal p90; Rho, homólogo de la GTPasa Ras; Sos, proteína son of sevenless. Imagen adaptada de Paunovic y col⁵⁸, permitido por Springer Nature.

Tal y como se muestra en la figura 4, los factores de crecimiento, y el proto-oncogén Ras estimulan la ruta de activación de ERK1/2. Esta vía tiene un papel clave en la patogenia de la AR, ya que su activación conduce a la expresión de mediadores inflamatorios que perpetúan la inflamación. Por ejemplo, se ha observado que tras la estimulación de FLS de pacientes con AR, con factor de crecimiento epidérmico (EGF)⁵⁹ o con la citoquina artrítica IL-328⁵⁸, se activa la vía ERK, mediando la generación de la PEG2 y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en un caso o la inducción de IL-6, IL-8 y del factor 1 derivado de células estromales (SDF-1/CXCL12) en otro, respectivamente. Además se ha encontrado activada en otros tipos celulares, como en células mononucleares, donde contribuye a la síntesis patogénica de TNF⁵⁸, o en macrófagos, transduciendo la liberación de IL-6, IL-12, IL-23 y TNF⁶⁰ o de MCP-1⁵⁸. La activación de esta ruta por mediadores proinflamatorios, también se ha relacionado con la destrucción articular, como en el caso de la liberación de MMP1 en FLS tras la estimulación con IL-1 β ⁵⁸. Otro aspecto importante a mencionar en la función de ERK en la AR, es la actuación como modulador de varias señales de inducción de la apoptosis en sinoviocitos reumatoides. Varios estudios^{61,62} han demostrado el efecto antiapoptótico en la vía Fas debido al aumento de expresión de ERK, donde actuaría a nivel de inhibición de caspasa 8 y la proteína agonista del dominio de la muerte que interactúa con BH3 (BID). Esta función podría explicar, por una parte, la resistencia de los FLS a la apoptosis inducida por Fas ligando de membrana (mFasL).

Al contrario que en ERK, la vía de JNK se activa normalmente tras la exposición a estrés extracelular, como por ejemplo, rayos ultravioleta (UV), hiperosmolaridad o choque térmico. También puede ser activada mediante citoquinas, como TNF o IL-1 β o activarse tras la unión del ligando a los TLR, regulando así la respuesta del sistema inmune innato⁶³. La regulación de las JNKs se basa en la fosforilación de un amplio abanico de sustratos con distintas

funciones celulares. Entre sus sustratos destacan el factor de transcripción c-Jun, que al ser fosforilado por JNK potencia su actividad transcripcional. También son activadas por esta vía, las proteínas que conforman la proteína activadora del factor de transcripción (AP-1), implicado en la regulación transcripcional de una gran variedad de genes y en la expresión de miRNA. La cascada JNK está implicada en distintas funciones celulares, como apoptosis, proliferación, migración celular, angiogénesis o regulación de la expresión de citoquinas y MMPs. En la inducción de la apoptosis, la cascada de fosforilación de JNK se desencadena tanto en la vía de apoptosis intrínseca como extrínseca, y por regla general, la activación constitutiva de la vía JNK se asocia con incremento de la apoptosis, mientras que la activación puntual y transitoria con la supervivencia celular. Sin embargo, aunque se conoce que la vía JNK-AP-1 se encuentra activada en los sinoviocitos reumatoides, parece no ser eficiente en la transducción de la señal apoptótica; aunque, la escasa apoptosis inducida por Fas, de los FLS, se produce a través de esta vía. Por el contrario, otra posibilidad contempla que la activación de JNK en los sinoviocitos podría ejercer un efecto antiapoptótico. Así, en células deficientes para p53, JNK tendría un efecto antiapoptótico, en sinoviocitos reumatoides (que también tienen *per se* alteraciones en p53), la activación de la vía ejercería el mismo efecto^{63,64}.

Por otro lado, JNK se ha implicado en la angiogénesis, ya que promueve la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que contribuye al mantenimiento de la vascularización de la sinovia inflamada. Además se ha implicado en la quimiotaxis de leucocitos hacia la sinovia y en el movimiento celular de los FLS, ya que la activación de JNK es fundamental en la generación de estructuras como adhesiones focales, microtúbulos y proteínas filamentosas intermedias⁶³. Por ejemplo, la fosforilación de la paxilina por JNK es esencial en la formación de adhesiones lábiles, imprescindibles en la rápida migración celular⁶⁵.

Finalmente, además de la regulación de la expresión de moléculas proinflamatorias, una de las mayores contribuciones de la vía JNK a la patogenia de la AR es su implicación en la regulación de MMPs. Las citoquinas TNF e IL-1 β promueven la degradación de la matriz extracelular, mediante la regulación de la expresión de las MMPs por la activación de la vía JNK-AP-1⁵⁸.

Los mayores inductores de la vía de p38 son los estímulos inflamatorios, como el lipopolisacárido (LPS), TNF e IL-1 β . La activación de la vía de p38 lleva a la fosforilación de diversos substratos, como el Hsp27, el MAPKAP2 o factores de transcripción como ATF2, STAT1, complejo Max/Myc, MEF2, ELK1 o MSK1. Esta diversidad es la responsable de las múltiples funciones que regula p38, entre las que destacan la angiogénesis y la quimiotaxis. En la AR, p38 regula la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, como E-selectina y la proteína 1 de adhesión de células vasculares (VCAM1), ambas proteínas responsables de la trans migración de los leucocitos a la sinovia. También es muy importante la regulación de la inflamación sinovial⁶⁶, en la que al igual que ocurre con la activación de la vía JNK; p38 se activa por mediadores inflamatorios y media la liberación de citoquinas proinflamatorias. Además, la activación de p38 contribuye a perpetuar la sinovitis por el control del ciclo celular, apoptosis, activación de neutrófilos e inducción de óxido nítrico. Por otro lado, también es destacable su función en la destrucción del cartílago y hueso, estando implicada en la liberación de MMPs y en la regulación de la síntesis y activación de RANKL. Así, se ha descrito que en ratones de modelos animales de artritis tratados con inhibidores de p38, el daño del cartílago disminuye⁶⁶.

Aunque las quinasas más estudiadas son las MAPKs, porque son las efectoras finales de la activación de la cascada, las quinasas *upstream*, como MAPKK o MAPKKK también han sido objeto de estudio en el desarrollo de enfermedades. Por ejemplo, la MAP3K5, también conocida como quinasa

reguladora de la señal de apoptosis (ASK1), se ha implicado en la inducción de la apoptosis por Fas mediante la activación de las vías JNK y p38⁶⁷. Otro estudio más reciente, mostró que el silenciamiento del gen ASK1 *in vitro*, redujo la apoptosis por estrés oxidativo en cardiomiocitos, debido a una disminución de la fosforilación de las vías p38, JNK y NF- κ B⁶⁸. No obstante en sinoviocitos reumatoides, se observó el efecto contrario, pues la sobreexpresión de ASK1, redujo la viabilidad de los FLS, mostrándose como una diana interesante para el tratamiento de la AR⁶⁹.

Fosfoinositol 3 quinasa/ proteína quinasa B (PI3K/AKT)

Las PI3K son una familia de enzimas que fosforilan la posición 3'-OH del anillo de inositol de los fosfoinositoides. Se han dividido en tres clases basándose en sus características estructurales y en la especificidad de sustrato. Las PI3K se activan por una amplia variedad de distintos estímulos, incluyendo factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores, Ig y antígenos⁷⁰. La estimulación de la PI3K lleva a la activación de quinasas, destacando la proteína AKT, clave en la regulación de numerosos procesos biológicos. Por ejemplo AKT activada promueve la proliferación celular, tiene acción antiapoptótica por la regulación de caspasa 9 y la proteína promotora de muerte asociada a Bcl-2 (BAD), entre otras, estimula la motilidad celular por su implicación en la cascada Ras, regula la degradación y modifica la acción de distintos factores de transcripción⁷⁰.

Varios estudios han demostrado la implicación de la cascada de señalización PI3K/AKT en el desarrollo de la AR⁷⁰⁻⁷³. La señalización por esta vía se activa por factores de crecimiento ligados a la progresión de la enfermedad, como VEGF y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)⁷⁴. El estudio de Bartok y col⁷³ demostró que esta vía se encuentra activada de manera anormal en los FLS reumatoides (en comparación con FLS de pacientes con artrosis). Además describieron que la inhibición de PI3K δ en sinoviocitos reumatoides,

producía una disminución del crecimiento celular por PDGF, así como un incremento de la sensibilidad a apoptosis inducida por H_2O_2 , por lo que la activación constitutiva de la vía podría tener un papel promotor del crecimiento celular y supervivencia en los sinoviocitos, contribuyendo a la hiperplasia sinovial⁷³. Otro estudio anterior, de García y col⁷⁵ ya había demostrado que la inhibición de PI3K en sinoviocitos reumatoides, sensibiliza a la apoptosis inducida por Fas, mediante el aumento de la hidrólisis de la proteína proapoptótica BID. Asimismo la inhibición de esta vía sensibiliza a la apoptosis inducida por TNF en sinoviocitos reumatoides⁷⁶.

Además, en un estudio con modelos murinos de artritis, la deficiencia de PI3K δ o la inhibición farmacológica de esta molécula, redujo la inflamación articular y la progresión de la artritis, debido a una disminución en la migración de los neutrófilos y su menor acumulación en la articulación⁷⁷.

5.2. Factores de transcripción

Las vías de transducción terminan en la activación de distintas moléculas, entre las que se encuentran los factores de transcripción. Los factores de transcripción son reguladores de la transcripción génica, que actúan uniéndose a secuencias consenso del ADN, en regiones promotoras de genes, activando o reprimiendo su transcripción.

Distintos estudios en AR, han mostrado el papel clave de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1⁷⁸ en la patogenia de la enfermedad, aunque también hay que destacar el papel de otros, entre los que se incluyen, la familia de proteínas STAT, factores reguladores de IFN (IRFs), familia Forkhead (Fox), el factor de transcripción T-box 21 (TBX21) y T-box expresado en células T (T-bet), proteínas CEBPA (de sus siglas en inglés CCAAT-enhancer binding protein family) y los factores Ets⁷⁹.

NF-κB

Las proteínas de la familia de NF-κB se expresan de forma ubicua y son cinco miembros: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 (p50) y NF-κB2 (p52), los cuáles forman una variedad de homo y heterodímeros capaces de unirse a las regiones promotoras y regular la transcripción génica. La activación de estas proteínas, formación de dímeros y translocación al núcleo, está controlada por dos cascadas principales de señalización: la vía de activación clásica o canónica de NF-κB y la vía alternativa o no canónica, cada una activada por un conjunto de ligandos de señal. Ambas vías desempeñan papeles críticos en la regulación de genes implicados en múltiples niveles del sistema inmunológico, la progresión del ciclo celular, supervivencia celular, adhesión e inhibición de la apoptosis^{79,80}.

NF-κB se encuentra constitutivamente activado en la AR, y regula la expresión de citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión, proteínas implicadas en la proliferación celular, proteínas antiapoptóticas... en general, genes con papeles importantes en la patogénesis de la enfermedad^{79,81}. Por ejemplo, el trabajo de Bai y col⁸² demostró que NF-κB regula la resistencia de los FLS reumatoides a la apoptosis inducida por TNF, mediante el incremento de expresión de FLIP [proteína antiapoptótica, inhibidora de FLICE (enzima convertidora de IL-1β tipo FADD)]. Además, la inhibición de este factor de transcripción, inhibe la respuesta inflamatoria y la destrucción del tejido en la sinovia de pacientes con AR⁸³, y su bloqueo *in vivo* también reduce la severidad de la artritis⁸⁴.

AP-1

AP-1 está compuesta por miembros de la familia c-Fos, c-Jun y otros factores de transcripción. Este factor de transcripción transmite señales extracelulares a células inmunitarias, dando como resultado cambios en la

expresión de genes diana específicos. Los genes diana están implicados en los procesos inflamatorios a través de varios mecanismos, tales como la activación de la producción de citoquinas en cooperación con factores de transcripción de la familia NFAT, la regulación de la diferenciación de células T *naive* en T_h1 o T_h2 o la interacción y *trans*-represión del receptor glucocorticoide⁷⁹.

En FLS de AR, la expresión de AP-1 es mayor que en FLS de artrosis⁷⁸, y además se ha encontrado implicada en la patogenia de la enfermedad. Participa en la diferenciación de osteoclastos promoviendo así la destrucción ósea, ya que Fos/AP-1 integra las señales de RANKL y del factor de estimulación de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), factores necesarios para la diferenciación de los osteoclastos⁸⁵. Por otro lado, se ha propuesto que en la AR, la expresión de MMPs se regula, en cierta medida por AP-1, y por tanto el aumento de MMPs en la sinovia se correlaciona con el incremento de actividad de AP-1 en la patogenia de la AR⁷⁹.

6. La membrana sinovial

La membrana sinovial es una fina capa que reviste las articulaciones diartrodiales (aquellas articulaciones que tienen capacidad de movimiento) y permite cerrar la cápsula de la articulación. La membrana secreta el líquido sinovial, cuya misión es reducir la fricción entre los cartílagos y otros tejidos en las articulaciones, para lubricarlas y acolcharlas durante el movimiento, además de proveer de nutrientes al cartílago. Está formada por dos compartimentos anatómicos y funcionales: el *lining* sinovial, formado por una monocapa o bicapa de células y el *sublining* sinovial que consiste en un tejido conectivo que contiene vasos sanguíneos, fibroblastos, adipocitos y un número limitado de células inmunes residentes, como macrófagos y mastocitos. En el *lining* sinovial se encuentran dos tipos celulares en proporciones relativamente iguales, los

sinoviocitos tipo macrófago y los FLS, también conocidos como sinoviocitos tipo A y B, respectivamente⁵⁰. Cabe destacar que el *lining* carece de una membrana basal, uniones estrechas o desmosomas, permitiendo el movimiento de células y proteínas en el líquido sinovial con facilidad. Esta organización porosa contribuye a la difusión de los nutrientes al cartílago, pero también permite la acumulación de complejos inmunes, paredes celulares bacterianas y otro material patológico en la articulación^{48,50}.

Los sinoviocitos tipo macrófago, son células del linaje hematopoyético monocito-macrófago, que derivan de precursores mieloides de la médula ósea. Muestran un fenotipo muy similar a otras poblaciones de macrófagos residentes en distintos tejidos. Se cree que su función es la de eliminar células muertas y desechos celulares presentes en la cavidad articular, ya que se ha documentado, mediante microscopía electrónica, la presencia de vacuolas de actividad fagocítica. Además poseen capacidad de presentación de antígenos, por lo que podrían actuar como centinelas en la búsqueda de organismos infecciosos^{50,51}.

Los sinoviocitos tipo fibroblasto, son células mesenquimales caracterizadas por poseer un extenso retículo endoplasmático, matrices ribosómicas y un aparato de Golgi bien desarrollado, que indica su capacidad para una abundante síntesis de proteínas⁵¹. Estas células expresan proteínas características de todos los linajes de fibroblastos, como vimentina, colágeno tipo IV y V, moléculas de adhesión (integrinas) y marcadores de superficie, como la glicoproteína de membrana THy-1, también conocida como CD90⁴⁸. Sin embargo, comparados con fibroblastos de otras localizaciones anatómicas, incluidos los del *sublining*, los FLS se caracterizan por la expresión de proteínas específicas. Por ejemplo, presentan la UDP-glucosa-6-deshidrogenasa, enzima requerida para la síntesis de ácido hialurónico, un componente importante del líquido sinovial y de matriz extracelular. Secretan también un factor de aceleración de desintegración del

complemento (CD55), presente en otros tipos celulares no fibroblásticos⁴⁸. Además, muestran un alto nivel de ciertas proteínas comparado con otros tipos de fibroblastos, como VCAM1 y una molécula de adhesión selectiva, la caderina 11. Esta última, también está presente en osteoblastos, donde juega un papel muy importante en la agregación homotípica de los FLS^{50,51}. Gracias a la expresión de todas estas proteínas, los sinoviocitos son el principal elemento de formación de tejido articular durante el desarrollo; además, en adultos aseguran la integridad dinámica y estructural de las articulaciones mediante el control de la composición del líquido sinovial y de la matriz extracelular⁴⁸.

7. Características patogénicas de los sinoviocitos tipo fibroblasto en la artritis reumatoide

Los FLS tienen un papel fundamental en la patogenia de la AR. Durante el proceso inflamatorio sufren alteraciones graves y adquieren un fenotipo activado que se mantiene aún en ausencia del estímulo inflamatorio y que constituye la base de su comportamiento agresivo⁴⁸.

7.1. Proliferación y apoptosis en sinoviocitos reumatoides

Una de las características patogénicas más comunes en la AR, es la transformación de la sinovia en un tejido hiperplásico e inflamatorio, llamado *pannus*. Este crecimiento celular excesivo, se debe a un desequilibrio entre los mecanismos de proliferación y apoptosis de los FLS de pacientes con AR^{48,49}. No obstante, no se ha demostrado un incremento marcado de la proliferación celular en la sinovia de pacientes con AR o en cultivo celular⁴⁸. Aunque la proliferación de los sinoviocitos reumatoides puede verse incrementada por diferentes estímulos, entre los que se incluyen TNF⁸⁶⁻⁸⁸, INF γ ⁸⁹, quimioquinas⁹⁰ y factores de crecimiento⁹¹. Por otro lado, a pesar de que la proliferación intrínseca de los

FLS de pacientes con AR no parece estar alterada, sí ha sido bien constatada la resistencia a la apoptosis de los sinoviocitos reumatoides. En tejido sinovial de pacientes con AR, raramente se encuentran FLS apoptóticos⁹², e incluso, en cultivos *in vitro*, en ausencia de estímulos externos, los sinoviocitos reumatoides muestran resistencia a la apoptosis inducida por Fas^{75,93}. Este hecho llama la atención, debido a que tanto sinoviocitos, células T sinoviales, como macrófagos, muestran altos niveles de Fas y/o FasL⁹⁴.

De forma general, la apoptosis celular puede activarse a través de dos mecanismos, por la vía extrínseca o por la vía intrínseca. La vía extrínseca, se activa tras la unión de ligandos de muerte a sus receptores específicos, como el receptor Fas, también conocido como CD95, los receptores de TNF y los receptores R1 y R2 de TRAIL (ligando inductor de la apoptosis relacionada con TNF). En el caso de sinoviocitos reumatoides, la poca activación de la vía extrínseca, ocurre mayoritariamente, tras la unión específica a Fas de su ligando⁹⁵. Existen dos formas del ligando de Fas, el de membrana (mFasL), y el generado del procesado proteolítico de esta forma, el soluble (sFasL). Aunque ambas formas presentan afinidad por el receptor, sólo la forma mFasL ejerce la activación de Fas; por otro lado, el sFasL actúa como un inhibidor competitivo⁹⁶. Así pues, el proceso de activación, consiste en la unión de mFasL, lo que produce la agrupación de los receptores Fas y consecuentemente, los dominios de muerte intracelulares de los mismos, permitiendo el reclutamiento de la proteína FADD (dominio de muerte asociado a Fas). FADD posee un dominio efector de muerte citosólico (DED), capaz de unirse a procaspasas, como la 8 y la 10, formando un complejo denominado DISC (complejo de señalización inductor de muerte). La formación de este complejo puede inhibirse por la presencia de FLIP. Tras la formación de DISC, las procaspasas 8 y 10 sufren un proceso de autoproteólisis y adquieren actividad catalítica. De este modo, inician la cascada de caspasas efectoras, entre las que se incluyen la caspasa 3, 6 y 7. Las caspasas efectoras

clivan sustratos apoptóticos inactivándolos, como por ejemplo, ICAD, un inhibidor de la DNasa. De este modo, se permite la acción de la misma, produciendo fragmentación nucleosomal del ADN. Otras dianas de estas caspasas son las lamininas nucleares, las enzimas de reparación del ADN, como la poly-ADP-ribosa-polimerasa (PARP), y las proteínas del citoesqueleto como la actina^{96,97}.

Como se ha comentado, los FLS de pacientes con AR, muestran resistencia a la apoptosis por Fas, y distintos trabajos han demostrado alteraciones en la vía extrínseca, que podrían explicar este efecto⁹⁸. Por un lado, la presencia de sFasL es superior en líquido sinovial de pacientes con AR que de pacientes con artrosis, inhibiendo de forma competitiva la activación de la vía Fas⁹⁹. Además, se ha demostrado que sFasL produce a su vez, un incremento de la proliferación en sinoviocitos reumatoides¹⁰⁰. Por otro lado, TNF, incrementa los niveles de sFasL¹⁰¹ e induce la expresión de otro inhibidor de la activación de la vía Fas, el receptor señuelo 3 (DcR3)¹⁰², en sinoviocitos reumatoides. Asimismo, otros factores contribuyen a la resistencia a la apoptosis de los FLS en la AR, como son la expresión incrementada de moléculas antiapoptóticas, como FLIP y sentrin⁴⁸, la alteración de las vías las MAPKs^{61,63} o la activación constitutiva de la vía PI3K/AKT⁷⁵.

Como se ha comentado, la resistencia a la apoptosis que muestran los FLS de pacientes con AR, se debe fundamentalmente a alteraciones en la vía Fas, pero cabe destacar también otras vías apoptóticas extrínsecas alteradas en sinoviocitos reumatoides. Por ejemplo, TNF es un inductor de muerte habitual en otros tipos celulares, sin embargo, en los FLS no induce apoptosis, sino que por el contrario, esta citoquina dirige las células a la proliferación. Este efecto se ha relacionado con la posible activación constitutiva de NF- κ B en sinoviocitos reumatoides, puesto que TNF puede inducir apoptosis en estas células tras la inhibición de

NF- κ B¹⁰³. Otro mecanismo que parece contribuir a la resistencia a la apoptosis es la activación de la vía PI3K/AKT, porque la inhibición de la misma potencia la apoptosis inducida por TNF⁷⁶. Por otro lado, la apoptosis en los FLS también se puede inducir por la unión de TRAIL. Sin embargo, los estudios son controvertidos, y sugieren que la susceptibilidad a la apoptosis es aún menor que la inducida por FasL, y parece dependiente del ciclo celular⁹⁸.

En general, el proceso de apoptosis por vía extrínseca es suficiente para provocar la muerte celular, no obstante en sinoviocitos reumatoides, la apoptosis requiere un ciclo de la participación de la vía mitocondrial, es decir, la activación de la vía intrínseca. Las células en las que ambas vías interaccionan para converger en una ruta común de activación de cascadas de proteasas, se conocen como células de tipo II (figura 5)⁹⁸. La vía intrínseca o mitocondrial es la más conservada evolutivamente, y como su nombre indica, en ella desempeña un papel clave la mitocondria. En general, estímulos físicos o químicos producen la activación de proteínas de la superfamilia Bcl-2, como por ejemplo, BID, la proteína X asociada a Bcl-2 (BAX), BAD y la proteína antagonista/asesina homóloga de Bcl-2 (BAK), que provocan la pérdida de la integridad de la mitocondria. Por ejemplo, la caspasa 8 activada por la vía extrínseca, cliva a BID, generando BID truncada (tBID). Esta proteína se transloca a la membrana externa mitocondrial, causando permeabilización y liberación de factores proapoptóticos desde el espacio intermembrana de la mitocondria hacia el citoplasma. Entre estos factores está el citocromo C, que junto con el factor activador de la proteasa apoptótica 1 (APAF1) y la procaspasa 9 forma el apoptosoma. Este complejo promueve la activación de caspasa 9 dirigiendo a la cascada de caspasas efectoras. A su vez, las proteínas BAX y BAK, actúan como moléculas proapoptóticas, incrementando la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Proteínas de la misma familia, Bcl-2 y proteína del linfoma de

células B extralargo (Bcl-XL) protegen a las células de la acción de BAX y BAK^{96,97,104}.

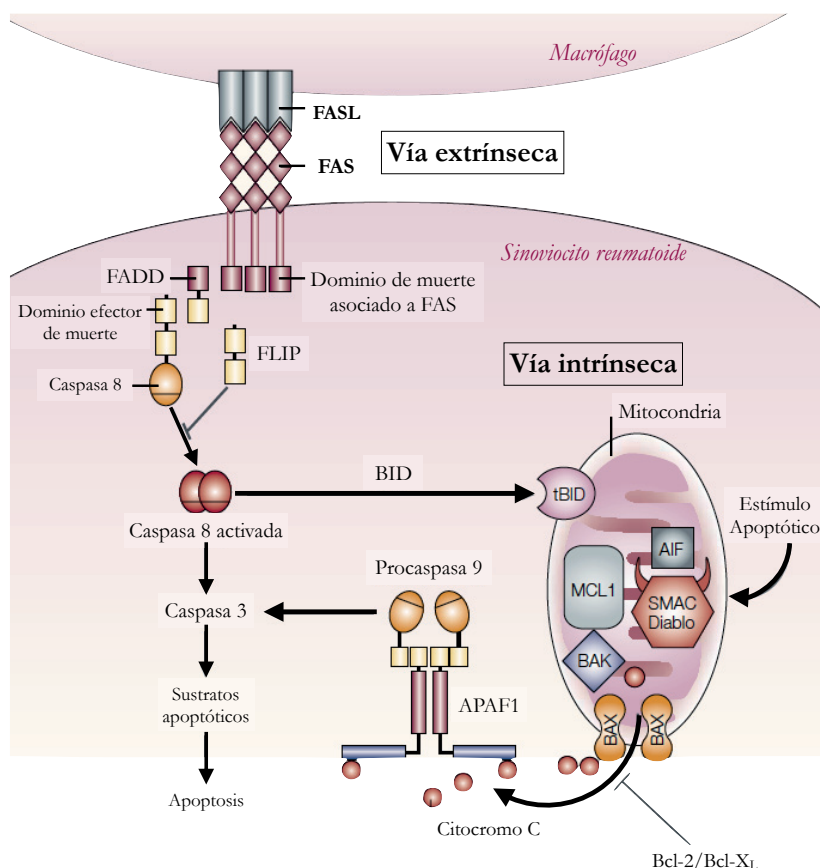


Figura 5. Diagrama esquemático de las vías de apoptosis en los FLS. En la figura se muestra un esquema de las dos vías de apoptosis en los FLS, con las principales moléculas implicadas. Las abreviaturas utilizadas son: AIF, factor inductor de apoptosis; APAF1, factor activador de la proteasa apoptótica 1; BAK, proteína antagonista/asesina homóloga de Bcl-2; BAX, proteína X asociada a Bcl-2; Bcl-2, protooncogen linfoma de células B 2; BID, agonista del dominio de la muerte que interactúa con BH3; FADD, dominio de muerte asociado a Fas; FasL, Fas ligando; FLIP, proteína inhibidora de FLICE (la enzima convertidora de IL-1 β tipo FADD); MCL-1, secuencia de leucemia de células mieloides 1; SMAC, segundo activador derivado de las mitocondrias de la caspasa. Imagen tomada y adaptada de Pope⁹⁷, permitido por Springer Nature.

En la patogenia de la AR, se han visto alteraciones en la familia de proteínas Bcl-2, que como se ha comentado son claves en la vía intrínseca de apoptosis de los sinoviocitos reumatoides. Por ejemplo, en FLS de pacientes con AR, se ha demostrado un incremento de la proteína antiapoptótica, Bcl-2⁹², y su asociación directa con el engrosamiento sinovial¹⁰⁵. Por otro lado, en sinoviocitos reumatoides hay una activación constitutiva de la vía PI3K-AKT, que lleva a la activación de la proteína secuencia de leucemia de células mieloides 1 (Mcl-1), inhibidora de las moléculas proapoptóticas BAX y BAK⁹⁸. Además también se expresa de forma constitutiva el factor de transcripción NF-κB, que regula la expresión de moléculas antiapoptóticas como Bcl-2 y FLIP. También regula A1, que se encuentra implicada en la inhibición de BAX y BAK⁹⁷.

Otro mecanismo de resistencia a la apoptosis descrito en los sinoviocitos reumatoides es la alteración del gen supresor de tumores p53. La proteína p53 controla la reparación del ADN tras daño celular. La exposición a estrés celular desencadena la vía de p53 a través del gen regulador del ciclo celular p21WAF/CIP1 (p21), produciendo parada del ciclo celular y la subsecuente reparación del ADN. Sin embargo, en un escenario de excesivo daño celular, el gen PUMA (modulador de la apoptosis sobreexpresado por p53) se activa dirigiendo la célula a la apoptosis⁹⁸. Aunque en AR-FLS la expresión de p53 es relativamente alta, es incapaz de inducir apoptosis. Esto puede deberse a que en sinoviocitos de pacientes se han encontrado mutaciones en el gen de p53 que lo inhabilitarían funcionalmente para activar a PUMA^{106,107}.

Hay que mencionar que las modificaciones postranscripcionales de proteínas de señalización también juegan un papel en la resistencia a la apoptosis de sinoviocitos reumatoides. Así se ha descrito una elevada expresión de la familia de proteínas SUMO (de sus siglas en inglés, small ubiquitin-like modifier) en FLS de pacientes con AR. Este aumento de expresión conduce a una

sumoilación de proteínas nucleares PML, con la consecuente captura de moléculas proapoptóticas como DAXX, inhibiendo así la apoptosis mediada por Fas⁹³.

7.2. Migración e invasión de sinoviocitos reumatoides

La migración e invasión celular son procesos complejos y muy regulados que requieren de la interacción entre células y la matriz extracelular. De forma general, las células adquieren capacidad de migración y se desplazan a zonas expuestas que pueden invadir. Una vez ahí se adhieren, forman estructuras invasivas y liberan enzimas encargadas de la degradación de la matriz. El estudio de Lefèvre y col¹⁰⁸ demostró que los sinoviocitos reumatoides poseen capacidad de invasión y migración. Para evaluar esta habilidad, se implantaron sinoviocitos reumatoides en un complejo cartílago-esponja, debajo de la piel de ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) (implante primario). En el flanco contralateral, se insertó el mismo complejo, pero sin los FLS de pacientes con AR. Tras 60 días, observaron que los sinoviocitos reumatoides habían abandonado el lugar de implantación primario y migrado a través del torrente sanguíneo, dirigiéndose específicamente hacia el cartílago expuesto en el flanco contralateral. Los mecanismos por los que estas células entran en el torrente sanguíneo y migran son confusos. Los estudios realizados hasta ahora sugieren que factores liberados del cartílago dañado, como pequeños fragmentos de la matriz, quimioquinas y factores de crecimiento, parecen ser de gran importancia al impulsar la atracción y migración de los FLS a articulaciones distantes^{49,108}.

Se ha descrito que en zonas articulares sanas, los FLS de AR, liberan citoquinas, como IL-1 β , que median la pérdida de proteoglicanos en el cartílago¹⁰⁹. Este paso es clave en el proceso invasivo de los sinoviocitos, porque les permite fijarse y activarse¹¹⁰. En el proceso de adhesión tienen un papel muy

importante las integrinas, particularmente las de la familia $\beta 1$, que interaccionan con moléculas del cartílago como fibronectina o colágeno. Así en ratones transgénicos para el TNF humano (hTNFtg), se ha demostrado que la pérdida de integrina $\alpha 2\beta 1$ reduce significativamente la gravedad de la destrucción del cartílago¹¹¹. No obstante, el papel de las integrinas es limitado y sólo es responsable de una parte del proceso de adhesión y activación de los FLS⁴⁹. Investigaciones recientes se han centrado, por lo tanto, en la identificación de otras moléculas de adhesión celular. Un ejemplo son los sindecanos; proteoglicanos de sulfato de heparina de membrana de tipo I que a través del dominio N-terminal extracelular son capaces de interactuar con una gran variedad de ligandos de la matriz extracelular, tales como colágenos, lamininas, tenascina, fibronectina y vitronectina, además de factores de crecimiento, quimioquinas y citoquinas. Específicamente en el campo de la investigación de la artritis se ha focalizado la atención en la proteína sindecano-4, debido a su localización específica dentro de las articulaciones durante la embriogénesis, así como su contribución a la patogenia de la artrosis^{112,113}. Además, la pérdida de sindecano-4 protege a los ratones del daño del cartílago y reduce la fijación de fibroblastos *in vivo* e *in vitro*¹¹⁰. Otras moléculas de adhesión importantes son VCAM1 e ICAM-1 que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y median en la adhesión celular e incremento de la expresión de MMPs⁵⁰. También hay que destacar el papel de la caderina 11, proteína clave en la agregación homotípica de los FLS, que se ha relacionado con la capacidad migratoria e invasiva de los FLS en la AR⁵¹. En la misma línea, el trabajo de Lee DM y col¹¹⁴ mostró que ratones deficientes en esta proteína, a los que se les indujo artritis por transferencia de suero de K/BxN, presentaron una mejoría en la evolución de la enfermedad, debido a una reducción de la respuesta inflamatoria y a la incapacidad de los sinoviocitos de invadir y degradar el cartílago.

En el proceso de degradación tisular, una vez que los FLS se han fijado al cartílago, se activan, y comienzan a invadir y destruir el mismo. Este proceso tiene lugar por la formación de estructuras similares a los invadopodios, conocidos como invadosomas. Son protrusiones celulares ricas en actina, capaces de mediar la proteólisis de la matriz extracelular. Su capacidad de degradación se basa en los niveles elevados de enzimas como MMPs o captesinas. Lauzier y col describieron algunas de las moléculas implicadas en la formación de los invadosomas, como la tirosina quinasa del Sarcoma de Rous (Scr)¹¹⁵, la función transglutaminasa (TG) de la TG-2¹¹⁶ y la actividad de la proteína Snail¹¹⁷. Además, también se han descubierto otras estructuras citoesqueléticas, implicadas en la invasión, como son las adhesiones focales, formaciones compuestas por la interacción de la quinasa de adhesión focal (FAK) y la proteína paxilina¹¹⁸.

8. Estrategia terapéutica en la artritis reumatoide

La Liga Europea contra las enfermedades reumáticas (EULAR), de forma regular desde el 2010, establece y publica una serie de recomendaciones para el tratamiento de varias enfermedades reumáticas, entre ellas, la AR.

Las recomendaciones marcan los pasos para iniciar una terapia efectiva inmediatamente después del diagnóstico y conseguir un objetivo claro, la remisión de la enfermedad¹¹⁹. De manera resumida, las guías dictan que tan pronto como se haya diagnosticado la AR, se debe iniciar la terapia con fármacos modificadores de la enfermedad (FAME). Estos fármacos se clasifican en sintéticos convencionales (FAMEsc), biológicos (FAMEb) o sintéticos dirigidos (FAMEsd). No obstante, los fármacos utilizados en primera línea del tratamiento son, únicamente, FAMEsc, y dentro de los mismos, siempre que sea posible, el metotrexato, excepto en pacientes con contraindicaciones al mismo, en el que se deben utilizar otros FAMEsc, como sulfasalazine o leflunomide. Además, cuando

se inicia o cambia el tratamiento con FAMEsc, pueden administrarse a corto plazo glucocorticoides, los cuales tienen efectos sintomáticos rápidos y modifican la enfermedad; pero debido a que se asocian con graves efectos secundarios a largo plazo, deben de ser eliminados lo antes posible.

Durante la fase activa de la enfermedad, los pacientes se monitorizan con frecuencia (1-3 meses), con el fin de ajustar la terapia si el primer ciclo de tratamiento no alcanza los objetivos de mejora. En este punto se tienen en cuenta los predictores de la gravedad de la enfermedad (factores de pronóstico), como son la alta actividad de la enfermedad a pesar del tratamiento previo, los títulos altos de ACPAs o FR, y el daño articular temprano observado en radiografía. Si no existen factores de mal pronóstico, otros FAMEsc son tenidos en cuenta, mientras que si existen factores de mal pronóstico, se valora el tratamiento con un FAME biológico (FAMEb) o un sintético dirigido.

Las terapias biológicas (FAMEb) actualmente aprobadas para la artritis reumatoide tienen cuatro modos de acción diferentes: inhibición de TNF, inhibición del receptor de IL-6, bloqueo de la coestimulación de células T y depleción de células B. Dentro de los inhibidores de TNF se han aprobado cinco compuestos, uno para uso intravenoso (infliximab) y cuatro para la aplicación subcutánea (adalimumab, certolizumab pegol, etanercept y golimumab). Otra diana biológica es la inhibición de IL-6, de la cual, actualmente solo existe un tratamiento disponible, el tocilizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido al receptor de IL-6, por otro lado se encuentran en fase de desarrollo otro inhibidor del receptor de IL-6, sarilumab e inhibidores de IL-6 como clazakizumab o sirukumab. Por otro lado, existe un fármaco inhibidor de la coestimulación de células T aprobado para la artritis reumatoide, abatacept y un fármaco dirigido contra el CD20 de las células B, el rituximab^{2,119}. Aunque también existen fármacos biológicos dirigidos frente a IL-1 β , como anakinra, no

se recomienda su uso, ya que muestran más efectos adversos que beneficios, teniendo un éxito limitado, comparado con los anti-TNF. Sin embargo, en base a esta diana biológica se desarrolló recientemente Canakinumab, un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 β , que se utiliza en enfermedades artríticas como la artritis juvenil idiopática sistémica o la gota artrítica¹²⁰.

Los medicamentos biológicos, anti-TNF y anti-IL-6 están dirigidos frente a los mediadores inflamatorios que desencadenan la señal de transducción, pero tienen varios problemas asociados; como por ejemplo el alto coste económico, la baja vida media, la administración parenteral y el alto riesgo de infecciones que produce en los pacientes. Por esa razón, se han propuesto como dianas farmacológicas otras moléculas implicadas en las rutas de transducción, como es el caso de las MAPKs, muy implicadas en la patogenia de la enfermedad. Sin embargo, en los ensayos clínicos realizados con distintos inhibidores no se han visto cambios con respecto al placebo^{57,58}. En contraste, otros fármacos probados contra distintas quinasas, como JAK y Syk, muestran resultados más esperanzadores. De forma general, las JAK juegan un papel central en la señalización de citoquinas, hematopoyesis, respuesta inmune y reacción alérgica. Actúan a través de la fosforilación del factor de la transcripción STAT, que dimeriza y se transloca al núcleo, donde se une al ADN y regula la transcripción de determinados genes⁵⁷. Actualmente los fármacos clave contra inhibidores de JAK, son tofacitinib o baricitinib, que conforman los llamados FAMEsd, incluidos en la recomendación de terapia del EULAR^{2,119}. Por otro lado, las Syk han generado interés en el campo de la reumatología porque transducen señales *downstream* del receptor de células B y de la fracción constante (Fc)⁵⁷.

En conclusión, los actuales tratamientos biológicos han mejorado el pronóstico de la enfermedad, pero sigue existiendo un porcentaje significativo de pacientes que no responde. Por este motivo, es necesaria la búsqueda de nuevas

dianas terapéuticas. Una vía inexplorada es la ruta de la vitamina A en la patogenicidad de los sinoviocitos reumatoides.





B. VITAMINA A

Las vitaminas son moléculas orgánicas esenciales para la vida. Su característica principal es que no pueden ser sintetizadas por el organismo, por lo que deben ser ingeridas a través de la dieta. La vitamina A forma parte de este grupo de moléculas, siendo un compuesto multifuncional implicado en distintos puntos clave del desarrollo humano, que van desde la embriogénesis hasta la edad adulta¹²¹.

1. Estructura química de la vitamina A

La primera definición química de la vitamina A en 1931 por Karrel y col¹²² describe a la molécula all-trans-retinol, de ahí que la vitamina A también reciba el nombre de retinol. Colectivamente, la vitamina A y sus metabolitos activos se conocen como retinoides. Los retinoides están compuestos por tres dominios estructurales distintos: un anillo de β -ionona, una cadena poliinsaturada espaciadora y un grupo polar, tal y como se muestra en la figura 6¹²³. Todos los retinoides son polares y altamente hidrofóbicos, lo que los hace muy similares a los ácidos grasos.

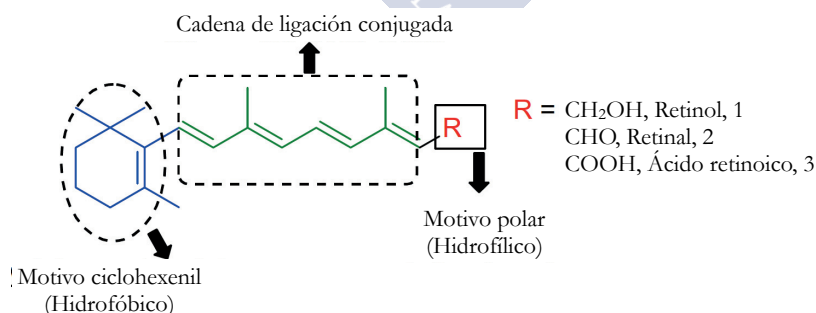


Figura 6. Estructura básica de los retinoides. La letra R representa el grupo polar, que puede tener distintos estados de oxidación, retinol, retinal o ácido retinoico. Imagen reimpressa y traducida de Das y col¹²³, con permiso de Elsevier.

Estos compuestos son muy inestables debido a la presencia de dobles enlaces conjugados en su estructura, lo que permite la fácil oxidación o isomerización en presencia de oxidantes, luz o calor. Por ejemplo, el grupo polar presente puede existir en distintos estados de oxidación, variando desde el bajo estado de oxidación de retinol a retinal, hasta la mayor oxidación, el ácido retinoico (RA). Y lo mismo ocurre con la isomerización, dando lugar al isómero 11-cis retinal y el isómero 9-cis RA (Figura 7)¹²⁴. Esto constituye una ventaja, ya que la pleiotropicidad de las funciones de la vitamina A en el organismo se lleva a cabo gracias a la multiplicidad de sus metabolitos activos¹²¹.

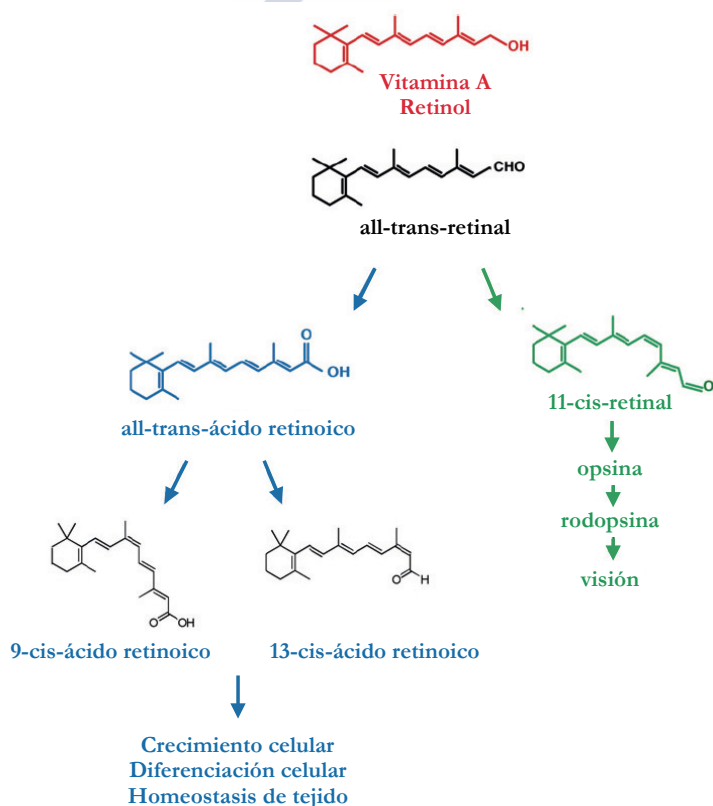


Figura 7. Esquema de los distintos tipos de retinoides según su estado de oxidación o isomerización. Figura tomada y modificada de Benbrook y col²⁸², permitido por Springer Nature.

2. Absorción, Metabolismo y Distribución

El retinol es un compuesto liposoluble, que cumpliendo el criterio que lo define como vitamina, no puede ser sintetizada *de novo* por los animales, con lo que es necesario obtenerlo a partir de la dieta. Se puede ingerir de dos formas, como “vitamina A preformada” o “provitamina A”. La vitamina A preformada se encuentra en forma de ésteres de retinilo (REs) en productos de fuentes animales, como leche, huevos e hígado. La provitamina A carotenoides está presente en frutas y verduras, siendo el β -caroteno la forma más común¹²⁵. La forma más común de transporte y almacenamiento de los retinoides en el organismo es la forma REs, debido a su estabilidad química. La retención de la vitamina A en determinados tejidos requiere una vía metabólica especializada, que necesita de la participación de proteínas de unión a retinoides, enzimas y receptores¹²⁶. En la figura 8 se muestran los mecanismos implicados en los procesos de absorción, almacenamiento y movilización de la vitamina A.

Los retinoides obtenidos de la dieta se absorben en la parte proximal del intestino delgado. Los absorbidos en forma de REs se deben transformar en retinol, para difundir pasivamente en los enterocitos; sin embargo, los carotenoides se unen a receptores Scavenger de clase B, tipo 1 (SCARB1), que son receptores de lipoproteínas de alta densidad. Una vez en el citoplasma, el β -caroteno se transforma en dos moléculas de retinal gracias a la acción de la enzima β,β -caroteno-15,15-dioxigenasa (BCO1). El retinal se convierte en retinol cambiando su estado de oxidación, y consiguiendo que dentro de los enterocitos todos los precursores de la vitamina A estén en su forma de retinol. La absorción de estas moléculas por los enterocitos depende de un gradiente de concentración, así que es necesario eliminar el retinol del sistema, para mantener una absorción dirigida. Esta eliminación se lleva a cabo mediante la unión del retinol a proteínas transportadoras de unión específicas a retinoides tipo 2 (CRBP2), que facilitan la

[illegible]

Figura 8. Diagrama del modelo metabólico actual de la vitamina A. Las abreviaturas utilizadas son las siguientes: 11-cis retinal (11c-RAL), alcohol deshidrogenasas (ADHs), aldehído deshidrogenasas (ALDH), β , β -caroteno (β C), β , β -caroteno-15,15-dioxigenasa (BCO1), proteínas celulares de unión al ácido retinoico (CRABPs), proteína celular de unión al retinaldehído (CRALBP), proteína celular 1 de unión al retinol (CRBP1), proteína celular 2 de unión al retinol (CRBP2), retículo endoplasmático (ER), lecitina:retinol aciltransferasa (LRAT), ácido todo-trans-retinoico (RA), todo-trans-retinaldehído (RAL), hidrolasas de éster de retinilo (REHs), ésteres de retinilo; (REs), retinil esterases (RESs), isomerasa retinoide (RPE65), todo-trans-retinol (ROL), proteína de unión al retinol sérico (RBP), receptor scavenger clase B, tipo I (SCARB1), deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDRs), receptor estimulado por el ácido retinoico 6 (STRA6), transtiretina (TTR). Imagen adaptada de Chelstowska y col ¹²⁶, cedido por Licencia Creative Commons (CC).

El principal reservorio de vitamina A es el hígado, donde se puede almacenar en grandes cantidades (10-1000 nmol/g) y también en menor medida, en el riñón y el pulmón. En el hígado, los retinoides en forma de REs, que llegan por vía linfática unidos a quilomicrones, se internalizan en los hepatocitos, donde son sometidos de nuevo a una rápida hidrólisis para liberar el retinol. Desde los hepatocitos la vitamina A se transporta a un subtipo de células hepáticas determinadas, las células estrelladas del hígado (CEH). Son más pequeñas y menos abundantes que los hepatocitos, representando sólo el 15% del total de células que conforman el hígado. Sin embargo juegan un papel esencial, ya que contienen entre el 90-95% de los retinoides hepáticos, además de otros lípidos no retinoicos. Estas células sólo cumplen una función de almacenamiento, ya que cuando se requiere el transporte de la vitamina A a los tejidos específicos, debe regresar a los hepatocitos. Aunque no se conoce actualmente cual es la cascada de señalización que dirige ese movimiento, si se sabe que cuando se inicia es necesaria la unión del retinol a unas proteínas específicas que facilitan su transporte a través del suero sanguíneo (proteínas de unión a retinol, RBP). Más del 95% del retinol total presente en la sangre se encuentra unido a RBP¹²⁶.

El retinol transportado por el torrente sanguíneo con la ayuda de los RBP, llega al tejido diana y es reclutado por el receptor estimulado por RA (STRA6). En el citoplasma se une a CRBP que permite su transporte hasta que es transformado en alguno de sus metabolitos activos.

3. Metabolitos biológicamente activos de la vitamina A

Aunque existen diversos compuestos derivados de la vitamina A, los metabolitos biológicamente activos, más importantes, son 11-cis retinal (11c-RAL) y los isómeros del ácido retinoico: all-trans RA (ATRA) y 9-cis RA (9cRA).

Cada uno de los metabolitos activos de la vitamina A cumple una función específica que se define a continuación.

3.1. 11-cis retinal

Se encuentra en las células fotorreceptoras formando parte del cromóforo rodopsina, al que estimula para permitir la percepción de luz e iniciar el ciclo visual. La rodopsina se compone de una parte proteica, la opsina, que se ve modificada conformacionalmente por 11c-RAL. Como se comentó anteriormente los metabolitos de la vitamina A son muy inestables y se pueden isomerizar en presencia de luz, así 11c-RAL pasa a all-trans-RAL excitando a su vez a la opsina. Esta proteína inicia una reacción enzimática en cascada, responsable de la fototransducción. Este proceso bioquímico es el encargado de transformar la información captada por las células fotorreceptoras en una señal eléctrica que se envía al cerebro¹²⁷.

3.2. Ácido retinoico

El ácido retinoico está implicado en diversas funciones orgánicas, principalmente modulando la transcripción de genes específicos. Como se comentó anteriormente, el retinol entra en la célula diana donde se transforma en ácido retinoico, tras dos oxidaciones consecutivas. Una vez en el citosol, los isómeros del ácido retinoico se unen a proteínas transportadoras que lo dirigen a receptores nucleares específicos.

Durante mucho tiempo, se estableció que la actividad transcripcional del ácido retinoico estaba mediada únicamente a través de dos familias de receptores nucleares del ácido retinoico, los receptores de ácido retinoico (RAR α , β y γ) y los receptores X del retinoide (RXR α , β y γ). Estos receptores, son factores de transcripción activados por ligando; cuando el receptor se une al ácido retinoico,

se activan, forman heterodímeros y se unen a elementos de respuesta específicos del ácido retinoico (RAREs). Las secuencias RAREs se localizan en regiones promotoras y permiten la supresión o activación de genes diana. Los receptores RAR pueden unirse con una afinidad similar a los dos isómeros conocidos del RA, ATRA y 9cRA, sin embargo los de tipo RXR sólo presentan un ligando de alta afinidad, el isómero 9cRA¹²⁸⁻¹³⁰. De hecho, el metabolito 9cRA fue identificado debido a la falta de afinidad de ATRA por los receptores RXR, en los trabajos de Heyman R y col¹³⁰ y Levin AA y col¹³¹. No obstante, a pesar de la afinidad de este isómero por el receptor RXR, su acción fisiológica se ha visto comprometida, debido a la imposibilidad de su detección *in vivo*¹²¹, hasta el año 2010, en el que se determinó y validó la presencia de 9cRA en células pancreáticas, y se estableció su implicación en la secreción de insulina estimulada por glucosa^{132,133}. De todos modos, es posible que la regulación de los receptores RXR sea a través de otros ligandos activos, algunos de los que presentan afinidad son ácidos grasos flexibles, como el ácido fitánico, el ácido oleico o el honokiol, lo que sugiere que este receptor se comportaría como un sensor del estado metabólico celular¹²¹.

El otro isómero conocido del ácido retinoico es ATRA, el metabolito más importante de la vitamina A. Posee importantes funciones genómicas, ya que juega un papel crítico en el desarrollo embrionario y actúa como regulador de la expresión génica en múltiples procesos esenciales del tejido adulto, como el crecimiento celular, diferenciación, desarrollo y homeostasis¹²¹. Como se ha comentado, durante mucho tiempo se estableció que ATRA actuaba únicamente como un regulador de la transcripción a través de RAR, sin embargo, diversos trabajos mostraron efectos del metabolito que no correspondían con genes activados a través de este receptor¹³⁴⁻¹³⁷. Por ejemplo, los genes activados por los receptores RAR se implicaron en la inducción de la apoptosis e inhibición del crecimiento celular^{138,139}; no obstante en algunos tipos celulares, ATRA indujo

proliferación y actuó como un agente antiapoptótico^{140–143}. De este modo, se descubrió que ATRA era un ligando selectivo de alta afinidad para el receptor huérfano activado por proliferador de peroxisoma β/α (PPAR β/α)¹³⁶. Como los receptores RAR, PPAR β/α pertenece a la superfamilia de receptores nucleares y regulan la expresión de genes diana mediante la formación de heterodímeros con los receptores RXR¹²¹. Así pues, ATRA posee importantes funciones genómicas a través de la regulación de dos receptores nucleares diferentes, y además, ATRA también tiene efectos extranucleares no transcripcionales, como la rápida activación de la vía de señalización MAPK tras la unión a RAR¹⁴⁴.

Debido a que este metabolito es el más común, el término de ácido retinoico se utiliza con referencia a ATRA habitualmente, aunque de forma estricta ácido retinoico incluiría los dos metabolitos. A partir de ahora, cuando hablemos de ácido retinoico nos estaremos refiriendo solamente al metabolito ATRA.

4. Papel del ácido retinoico y de las proteínas transportadoras en la regulación transcripcional

El papel de ATRA en la regulación génica requiere de su movilización al núcleo, donde activa los receptores nucleares, RAR o PPAR β/α , que promueven la expresión de determinados genes. El transporte de ATRA mediante proteínas específicas de unión a lípidos intracelular (iLBPs) determina la activación de unos receptores u otros. De este modo, la proteína celular 2 de unión al ácido retinoico (CRABP2) conduce ATRA a los receptores RARs nucleares y la proteínas de unión a ácidos grasos 5 (FABP5) dirige el metabolito hacia el receptor PPAR β/δ . Dependiendo de la expresión celular de estas proteínas transportadoras, los efectos de ATRA serán distintos, puesto que los genes que activan los RARs

difieren de los del receptor $\text{PPAR}\beta/\delta$ ¹³⁴. Estudios actuales apuntan a que la disregulación en el balance entre estas dos vías, interviene en desórdenes cognitivos, promueve el desarrollo de algunos cánceres y contribuye a la obesidad inducida por una alimentación alta en grasas¹³⁷.

4.1. El transportador CRABP2

CRABP2 es el principal transportador de ATRA; con una alta afinidad de unión al ligando, en el rango sub-nanomolar, mientras que la afinidad de FABP5 por ATRA es menor, con una diferencia de dos órdenes de magnitud. La proteína CRABP2 es citosólica, en ausencia de su ligando, pero una vez unida a ATRA, se activa la señalización de localización nuclear y se moviliza hacia el núcleo. En el núcleo, promueve la unión de ATRA a los receptores RAR, a través de los cuáles regula la transcripción génica. Distintos estudios en cáncer han demostrado que los genes diana de los receptores RAR están implicados en la activación de la diferenciación y apoptosis, y en la inhibición del crecimiento celular¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Por otro lado, estos receptores, además de promover la expresión de genes diana, tienen un efecto represor del factor de transcripción AP-1, suprimiendo la expresión de los genes regulados por el mismo¹⁴⁸.

No obstante, no en todos los tipos celulares la unión del metabolito ATRA a CRABP2 lleva al transporte al núcleo y a la consecuente activación de los receptores RAR, ya que se han observado otros papeles no convencionales. Por ejemplo, en células de glioblastoma multiforme¹⁴⁹, se ha demostrado que el transportador CRABP2 retiene a ATRA en el citoplasma, impidiendo que se una a sus receptores nucleares y atenuando su función transcripcional. Además, en este mismo estudio se observó un papel regulatorio del transportador, independiente de la unión a su metabolito, ya que la ausencia de CRABP2 se correlacionaba con la disminución de la expresión de la proteína antiapoptótica CRYAB. Esta función independiente de CRABP2 ya se había descrito en dos

trabajos anteriores^{150,151}, en los que se demostró que este transportador poseía una función en la regulación post-transcripcional, gracias a la estabilización de la proteína HuR. La proteína HuR pertenece a una familia de proteínas de unión a ARN, y posee diversas funciones biológicas relacionadas con la regulación post-transcripcional de genes en animales, incluyendo el *splicing* del ARNm, su exportación nuclear y su estabilización. Esta última actividad la ejerce uniéndose a los elementos ricos en AU en 3'-UTR del ARNm diana, protegiéndolo contra la degradación y favoreciendo su expresión. En los trabajos del grupo de Noa Noy^{150,151}, se demostró que CRABP2 actúa conjuntamente con la estabilización de HuR y promueve la afinidad por ciertos ARNm, entre los que se incluyen transcritos de genes proapoptóticos como Apaf-1 o Casp7 e, inclusive, para el propio HuR. De este modo, CRABP2 puede mejorar las respuestas apoptóticas a través de su cooperación con HuR¹⁵¹. Por el contrario, otros estudios apuntan a que la acción independiente de CRABP2 ejerce un efecto antiapoptótico; como el ya comentado en glioblastoma multiforme¹⁴⁹, o en células de tumores malignos de la vaina del nervio periférico, en donde la ausencia de CRABP2 se relaciona con un aumento de la citotoxicidad y apoptosis celular, mediante la implicación de la vía de IFN tipo 1¹⁵².

Con el fin de determinar la función de las proteínas transportadoras CRABP1 y CRABP2 en la señalización de la vitamina A *in vivo*, Lampron y col¹⁵³ generaron ratones deficientes en ambas proteínas. Sorprendentemente, mostraron que los ratones deficientes fueron normales, con la excepción de una discreta anomalía en las patas, en los ratones KO para CRABP2. Por lo tanto, este trabajo demostró que ambas proteínas no son fundamentales ni durante el desarrollo, ni en la vida adulta¹⁵³.

Estudios posteriores han mostrado la implicación de CRABP2 en otras funciones celulares como proliferación, control del ciclo celular y apoptosis¹³⁴,

por lo que se ha planteado como posible diana terapéutica en enfermedades como el cáncer¹⁵⁰.

4.2. El transportador FABP5

La unión de ATRA a este transportador sólo se produce en células donde el ratio FABP5/CRABP2 es elevado, debido a que la afinidad del retinoide por FABP5 es mucho menor. Además, mientras que CRABP2 se une específicamente a ATRA, FABP5 se une a una larga lista de distintos compuestos¹³⁷. Al igual que ocurre con CRABP2, FABP5 permanece en el citosol en ausencia de su ligando, pero una vez que se une a ATRA, se moviliza hacia el núcleo. En el núcleo, coopera selectivamente con el receptor $\text{PPAR}\beta/\delta$ ¹⁵⁴ activando genes proliferativos y antiapoptóticos. Por lo tanto, la señalización de los retinoides a través de $\text{PPAR}\beta/\delta$ incrementa la proliferación y la supervivencia celular, explicando así la resistencia al tratamiento con retinoides de algunos cáncer de próstata, pancreáticos y de mama^{124,134,155}.

5. Efectos extranucleares del ácido retinoico

Actualmente es bien conocido que el ácido retinoico induce efectos genómicos y no genómicos. Estos últimos se producen a través de los receptores RAR que se encuentran fuera del núcleo, en balsas lipídicas de la membrana plasmática. Varios estudios demostraron que dependiendo del tipo celular, la unión del ácido retinoico al RAR extranuclear activa rápidamente distintas cascadas de quinasas. Así, en fibroblastos, células murinas de carcinoma de embrión, células tumorales de mama y células de leucemia, el ácido retinoico activa los receptores RAR de las balsas lipídicas que, a su vez, interaccionan con proteínas $\text{G}\alpha\text{q}$. De este modo, las proteínas G desencadenan la activación de la vía p38 o activan las proteínas Rho-GTPasas. Sin embargo, en células neuronales,

células de Sertoli y células madre embrionarias, los receptores RAR actúan sobre las quinasas PI3K o Scr, que a su vez fosforilan a la quinasa ERK^{121,144}.

Los efectos extranucleares del ácido retinoico sobre las MAPKs contribuyen a la regulación de la expresión génica. Así, la activación de la quinasa p38 o de ERK, tras la adición de ácido retinoico, lleva a la fosforilación de correpresores o coactivadores de los receptores RAR. De esta manera se produce un intercambio de los complejos correguladores y se facilita la expresión génica. Por otro lado, la activación de p38 o de ERK, llevan a la estimulación de la proteína quinasa activada por estrés y mitógenos, MSK1. Esta proteína, regula la transcripción de genes relacionados con los receptores RAR, mediante la fosforilación de histonas. Con la modificación de las histonas, se consigue un desempaquetamiento de la cromatina, y se facilita la unión de RAR a estas zonas promotoras, promoviendo así la expresión génica^{121,144}.

6. Efectos funcionales de los retinoides

Los retinoides han sido ampliamente estudiados por su implicación en distintas funciones celulares como proliferación, apoptosis, diferenciación, migración e invasión celular.

6.1. Proliferación celular

Diversos estudios han descrito la reducción de la viabilidad y la proliferación celular *in vitro*, con el tratamiento de ATRA. Las vías implicadas en la regulación de la proliferación por parte de ATRA son muy diversas. Por ejemplo, se ha descrito que en algunos tipos celulares tumorales, actuaría regulando las quinasas dependientes de ciclinas (CDK); así en células de cáncer gástrico aumentó la expresión de inhibidores de CDKs¹⁵⁶ y en líneas tumorales de cáncer de mama disminuyó la expresión de CDK1 y CDK2^{157,158}. Por otro lado,

el trabajo de Manor y col¹⁵⁹ mostró que la activación de los receptores RAR, fue responsable del efecto antiproliferativo del ácido retinoico. En este estudio, se observó que la expresión estable de la proteína transportadora CRABP2 indujo una disminución de la proliferación de una línea tumoral de cáncer de mama. Además, este efecto también se demostró en un modelo *in vivo* de cáncer de mama, MMTV-*neu*, en el que la inserción de un vector de expresión para CRABP2, favoreció la inhibición del crecimiento tumoral por parte de ATRA¹⁵⁹. Asimismo, se ha descrito que ATRA ejerce su efecto a través de la regulación de vías de señalización intracelular, como la supresión de la actividad de la proteína inhibidora de tirosín quinasa, y con ello de AKT, en la línea GIST-T1 de células tumorales gastrointestinales¹⁶⁰, o el incremento de activación de Smad en células de osteosarcoma¹⁶¹. Otros mecanismos implicados en la inhibición de la proliferación inducida por ATRA son la regulación de proteínas implicadas en la viabilidad celular, el tratamiento con retinoide produjo el aumento de expresión de FGF18 en cáncer de hueso¹⁶², de HOXB13 en células de cáncer de próstata¹⁶³, o del gen Calmin y la proteína tumoral 52 en células de neuroblastoma^{164,165}. En células de leucemia, el tratamiento con ácido retinoico aumentó las uniones gap y de este modo inhibió la proliferación celular¹⁶⁶. Asimismo el efecto antiproliferativo del retinoide se ha demostrado también en tipos celulares no tumorales, ya que redujo la proliferación en mastocitos¹⁶⁷, queratinocitos palatales¹⁶⁸, células del giro dentado del hipocampo¹⁶⁹ y en células precursoras CD34+, durante la mielopoiesis¹⁷⁰.

A pesar de las numerosas evidencias que demuestran el papel de ATRA como inhibidor de la proliferación, en algunos tejidos se ha determinado el efecto contrario, la promoción del crecimiento celular. Por ejemplo, en neuronas, es crítico para la supervivencia¹⁷¹ y en queratinocitos basales, la administración tópica de retinoides estimula la reparación dérmica e induce hiperproliferación^{172,173}. Estos efectos diferenciales dependiendo del tipo celular,

parecen deberse a la expresión de las proteínas transportadoras CRABP2 y FABP5. El grupo de Noa Noy demostró en ensayos *in vitro*, que en células con un ratio CRABP2/FABP5 elevado, ATRA llevaría a la detención del ciclo celular y en células con un ratio CRABP2/FABP5 bajo, a la proliferación celular¹³⁴. Como se ha comentado anteriormente, esto se debe a que la unión de ATRA a CRABP2 dirige a la activación de RAR¹⁴⁵ y la de FABP5 a PPAR β / δ ¹³⁶. Esta hipótesis también ha sido demostrada *in vivo*, en el modelo murino de cáncer de mama MMTV-*neu*¹⁵⁵, en el que el tratamiento con ATRA indujo crecimiento del tumor asociado al incremento de la expresión de FABP5. En este estudio se demostró la activación de genes diana de PPAR β / δ , como la quinasa PDK1, que activa al factor de supervivencia AKT1 y al factor de crecimiento VEGF. Además, ATRA también se ha implicado en la regulación de la proliferación de forma indirecta, mediante la inhibición de la actividad del supresor de tumores PTEN, lo que lleva a la activación de la vía PI3K dependiente de Rho-GTPasa¹²⁴.

A pesar de que los efectos de supervivencia promovidos por el ácido retinoico se deben mayoritariamente a la regulación transcripcional por PPAR β / δ , existen otros mecanismos descritos por los que el ácido retinoico puede promover supervivencia celular. Por ejemplo, en el desarrollo folicular del ovario, el ácido retinoico estimula la proliferación de células granulosas a través de la modulación de la señalización del Ca²⁺¹⁷⁴. Otro ejemplo sería la regulación del epitelio salivar, donde la inhibición de la vía del ácido retinoico produciría una represión en el crecimiento celular por el aumento de la expresión de las queratinas 5 y 14¹⁷⁵.

6.2. Apoptosis celular

Se ha demostrado que el ácido retinoico induce o sensibiliza a la apoptosis a distintos tipos celulares, a través de la activación de los receptores RAR y su

consecuente regulación de la expresión de genes proapoptóticos. Entre los genes diana de estos receptores se encuentran moléculas implicadas en la fragmentación del ADN y múltiples proteínas pertenecientes a la cascada de apoptosis de la vía intrínseca, como caspasas, proteínas Bcl-2 y factores de transcripción¹²⁴.

Diversos estudios han mostrado que el tratamiento con ATRA o con análogos del metabolito incrementa la apoptosis mediante el aumento de la expresión de caspasas^{145,176}. Por ejemplo, Mrass y col mostraron que el tratamiento con ATRA en queratinocitos, resistentes a la apoptosis inducida por rayos UV, indujo la apoptosis masiva de los mismos tras irradiación. El aumento de la regulación transcripcional de las caspasas 3, 6, 7 y 9 fue el mecanismo implicado¹⁷⁶. Asimismo, en células de carcinoma mamario, MCF-7, el ácido retinoico indujo apoptosis mediante el aumento de la expresión de la caspasa 9 y 7, dianas directas de la actividad transcripcional del ácido retinoico a través de los RAR¹⁴⁵. En este trabajo, también se demostró la necesidad de una expresión elevada de CRABP2, para translocar el ácido retinoico específicamente hacia los receptores RAR.

Además de la regulación de caspasas, el ácido retinoico puede también modular la expresión y activación de la familia de proteínas Bcl-2. Niu y col¹³⁹ demostraron en células MCF-7 que el tratamiento con ácido retinoico producía la activación de la proteína proapoptótica Bax, y la disminución de los niveles de expresión de la molécula antiapoptótica Bcl-2. En el mismo sentido, se observó que en células de cáncer de estómago tratadas con ATRA, aumentaba la expresión de Bax y disminuían los niveles de otra proteína antiapoptótica, la survivina¹⁶⁰. La regulación transcripcional por parte del ácido retinoico de moléculas antiapoptóticas, como Bcl-2 o survivina, se ha descrito en otros trabajos en células de cáncer de mama^{138,158} y células de adenocarcinoma endometrial¹⁷⁷. Algunos estudios, principalmente en cáncer de hígado, asocian la

regulación de estas proteínas de la familia Bcl-2, con una sobreexpresión de p53 inducida por el ácido retinoico^{178,179}.

Los genes regulados por los receptores RAR tras la unión del ácido retinoico, incluyen también genes implicados en la vía extrínseca de la apoptosis. Por ejemplo, se ha descrito que en células NB4 [células de leucemia promielocítica aguda (APL)], el tratamiento con ATRA activa RAR e induce la expresión de IRF-1, que se une al promotor del ligando de muerte TRAIL y promueve su expresión^{180,181}. Debido a que TRAIL es un ligando secretado, su regulación por el ácido retinoico puede inducir la apoptosis tanto de forma autocrina como paracrina, lo que conduciría a la muerte de las células vecinas amplificando el efecto del ácido retinoico. En cáncer de mama, también se ha demostrado que el tratamiento con ácido retinoico promueve la expresión de IRF-3 y con ello la activación de TRAIL¹⁸². En otras líneas celulares tumorales, la sensibilización a la apoptosis por TRAIL, se produjo debido a un aumento de la expresión del receptor 1 de TRAIL (TRAILR1) tras el tratamiento con ATRA¹⁸³. A su vez, en cáncer de pulmón y células de leucemia, se ha demostrado que el ácido retinoico induce la expresión de receptores del ligando TNF, llevando a un incremento de la apoptosis inducida por TNF^{184,185}. Asimismo, en el estudio de Mathieu y col¹⁸⁶ se describió que ATRA incrementó la apoptosis inducida por TNF en células de APL, aunque en este caso, a través de la activación de la Poli ADP ribosa polimerasa (PARP1) y JNK. Por otro lado, el ácido retinoico también se ha implicado en la señalización apoptótica desencadenada por el receptor de muerte Fas. Además, en células Jurkat se ha descrito que ATRA inhibe la represión de la vía Fas mediada por mitógenos¹⁸⁷.

Aunque de forma general se puede considerar que el ácido retinoico es proapoptótico, en determinados tipos celulares tiene un efecto antiapoptótico. En esta línea, se ha descrito que los retinoides suprimen la apoptosis inducida por

radiación en células endoteliales capilares¹⁸⁸, aunque no se conoce el mecanismo implicado. Del mismo modo, se ha descrito que en células hematopoyéticas, ATRA suprime la apoptosis inducida por IL-6¹⁸⁹. Más concretamente, en hibridomas de linfocitos T, se ha demostrado que el ácido retinoico inhibe la apoptosis inducida por la activación del complejo TCR/CD3¹⁹⁰. Además, se ha descrito que ATRA inhibe la apoptosis inducida por la activación de receptores de muerte. Así, ATRA inhibió la apoptosis inducida por Fas en células T, mediante la disminución de la expresión de FasL¹⁹¹ y en células epiteliales de pulmón, el ácido retinoico inhibió la apoptosis inducida por TNF, mediante la disminución de la expresión de la proteína de unión tipo 2 al factor de crecimiento parecido a la insulina (IGFBP-2), aunque no está claro el mecanismo de acción de esta proteína en la muerte celular programada¹⁹². Asimismo, cabe destacar, que en células de cáncer de mama, con un ratio bajo CRABP2/FABP5, el ácido retinoico, se une al receptor PPAR β/δ e inhibe la apoptosis, por la expresión de PDK1 y AKT, como se ha comentado anteriormente¹³⁴.

Además, el ácido retinoico se ha implicado en la apoptosis inducida por otros mecanismos. Así, Choudhary y col demostraron que ATRA protege a cardiomiocitos frente a la apoptosis inducida por angiotensina II y estrés mecánico, inhibiendo la generación de especie de oxígeno reactivo (ROS), reduciendo la liberación del citocromo C e incrementando el ratio Bcl-2/Bax¹⁹³. En el mismo sentido, en células progenitoras de la retina se ha demostrado el efecto antiapoptótico del ácido retinoico mediante el aumento de la expresión de la proteína quinasa A (PKA)¹⁹⁴. Por otro lado, en un estudio en ratas expuestas a arsénico, se observó disminución de la apoptosis en el útero con el tratamiento de ATRA, mediante la disminución de la expresión de p53 y de la formación de radicales libres¹⁹⁵.

6.3. Migración e invasión

Diversos estudios han mostrado que el tratamiento con retinoides inhibe la capacidad de migración e invasión celular^{196–199}. Así por ejemplo, el trabajo de Dutta y col¹⁹⁷ en la línea de cáncer de mama MDA-MB-231, mostró que el tratamiento con ATRA inhibió la migración sobre fibronectina y se asoció con la disminución de la actividad de la MMP9. La actividad de MMP9 se redujo como consecuencia de la disminución de la expresión del gen de MMP9 y del receptor de EFG (EGFR) implicado en su activación; además aumentó la expresión de la proteína de tejido inhibidora de MMPs (TIMP-1). Por otro lado, en este mismo estudio se observó que el tratamiento con ATRA redujo la expresión de las integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha V\beta 3$, de la quinasa ligada a integrinas (ILK) y de FAK. Estas moléculas son claves en la interacción célula-célula, célula-matriz y en la promoción de la motilidad celular y la invasión, por lo que su disminución es clave en la inhibición de la migración sobre fibronectina. En la misma línea, el trabajo del grupo de Flamini mostró que el tratamiento con ATRA reduce la transcripción de FAK, c-Scr o moesina en células de cáncer de mama¹⁹⁸. Este mismo grupo mostró en otro trabajo que el tratamiento con ATRA no solo interfiere en la regulación transcripcional de estas moléculas, sino también en su regulación posttraduccional. De esta forma, ATRA fosforila rápidamente FAK, moesina y paxillina; esta modificación de FAK induce la translocación de la proteína al núcleo, inhibiendo así la formación de adhesiones focales¹⁹⁹. Otros grupos, como el de Zanetti y col¹⁹⁶, describieron que ATRA puede interferir en la regulación de otras vías, como la vía NOTCH y producir el mismo efecto antimigratorio. Otros estudios también han observado un efecto antimigratorio del ácido retinoico en células de distintos tipos de cáncer^{200–203}. Cabe destacar que en las células de cáncer de páncreas el ácido retinoico inhibe la migración de forma indirecta, a través del control de la migración de los fibroblastos asociados a las células tumorales²⁰⁴.

A pesar de la abundante bibliografía señalando el efecto antimigratorio del ácido retinoico, en algunos tipos celulares este induce el efecto contrario, promueve la migración. Por ejemplo el ácido retinoico que se expresa en las células dendríticas (DCs) es el responsable del tropismo de células T hacia el intestino²⁰⁵. También en DCs murinas, se ha observado que ATRA mejora la migración hacia los ganglios linfáticos drenantes mediante el aumento de la expresión de MMPs y de la disminución de sus proteínas inhibidoras, TIMPs²⁰⁶. Otros estudios, también han mostrado un efecto similar, así ATRA aumenta la migración en células de Schwann²⁰⁷ mediante el aumento de expresión de la proteína NEDD9; y en amniocitos primarios²⁰⁸ y en epitelio corneal²⁰⁹ mediante el incremento de la expresión de lisil oxidasa homóloga 4 (LOX4).

6.4. Respuesta inflamatoria

El tratamiento con ácido retinoico atenúa la respuesta inflamatoria en modelos murinos de patologías inflamatorias crónicas²¹⁰⁻²¹³. Mielke y col²¹³ observaron que el tratamiento con ATRA, redujo la respuesta inflamatoria en un modelo murino de colitis, debido a un aumento de los niveles de IL-22. En el mismo sentido, Hong y col²¹⁰ describieron que el tratamiento con ATRA redujo la inflamación en el modelo murino de colitis, aunque en este trabajo se asoció a una disminución de la actividad de NF- κ B y de los niveles de TNF. Anteriormente, este grupo ya había descrito que el tratamiento con ATRA en células de la mucosa intestinal de pacientes con colitis ulcerosa, induce disminución de la expresión de TNF, IL-17 y un aumento de FoxP3²¹⁴. Además, en neuronas de ratones en un modelo de isquemia cerebral transitoria, el tratamiento con ATRA disminuyó la expresión de TNF e IL-6²¹⁵.

Por otro lado, otros trabajos, han mostrado el efecto sinérgico del ácido retinoico con TNF o con otros estímulos proinflamatorios, como IL-1 β , aunque

no regule la expresión de los mismos. Así por ejemplo, en el trabajo de Chatterjee y col²¹⁶, en células de una línea de adenocarcinoma colorrectal, ATRA incrementó la expresión de CXCL7 inducida por TNF o IL-1 β , e inhibió la de CXCL16 y Midkine. Asimismo, en células de melanoma, el tratamiento conjunto de TNF y ATRA incrementó la expresión de IL-8²¹⁷. También en células de APL ATRA tuvo un efecto sinérgico, ya que promovió la activación de dianas relacionadas con la vía de TNF, como NF- κ B y del receptor tipo 2 de TNF (TNFR2)¹⁸⁵. El conjunto de estos datos demuestra la implicación de la vía de retinoides en la actividad de importantes mediadores de la inflamación.

7. Implicación de la vía de los retinoides en la artritis reumatoide

La implicación del ácido retinoico en la AR se ha estudiado principalmente en modelos murinos de la enfermedad. El primer estudio fue realizado en 1982 por Trentham y col²¹⁸, en el que el tratamiento de ratas con análogos del ácido retinoico incrementó la severidad de la artritis en un modelo de artritis inducida por colágeno (CIA). Sin embargo, la publicación de otro trabajo un año después inició la controversia del efecto del ácido retinoico en esta enfermedad. En este trabajo, los autores utilizaron el modelo de artritis por adyuvante en ratas y mostraron que el tratamiento con 13-cis-RA redujo la severidad de la enfermedad²¹⁹. Este tema quedó apartado durante más de una década hasta que el desarrollo de nuevas moléculas sintéticas del ácido retinoico y su uso con éxito en ensayos de tratamientos para otras enfermedades, hizo que se planteara de nuevo como un posible tratamiento para la AR. Kuwabara y col²²⁰ demostraron que el análogo del ácido retinoico, Am-80, (que se une al RAR α y β pero no al γ), redujo la incidencia de artritis en el modelo CIA de rata y se acompañó de un marcado descenso de los niveles de anticuerpos anti colágeno tipo II. En concordancia con este trabajo el estudio de Nozaki y col²²¹ observó un descenso

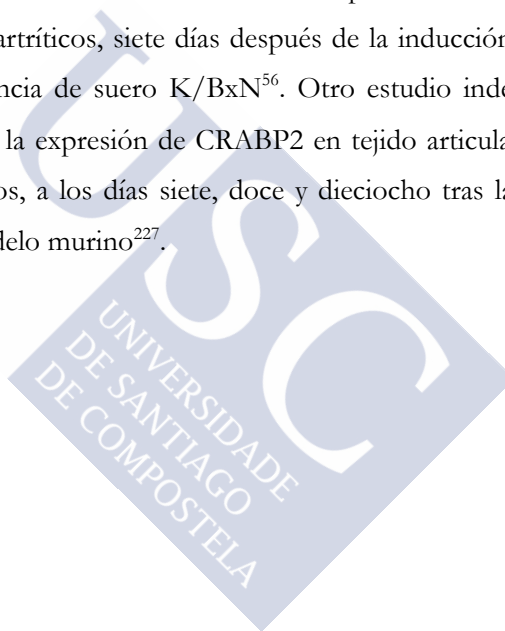
en la severidad de la artritis en el modelo CIA de ratón tras el tratamiento con ATRA. Este efecto se asoció con menor infiltración de macrófagos en la sinovia y reducción de los niveles de expresión de TNF, IL-6, CCL2 e IL-12 en células del bazo de ratones tratados en comparación con los controles no tratados. En el mismo modelo experimental, Kwok y col, observaron una disminución en el desarrollo de la artritis, junto con un descenso de la expresión de IL-17, tras el tratamiento de ATRA^{221,222}. En la misma línea, el trabajo de Naskar y col mostró que ratones tratados con Am-80 mostraban menor severidad de la artritis, en el modelo K/BxN²²³. Am-80 produjo un movimiento trópico de las células T_h foliculares hacia el intestino, disminuyendo los autoanticuerpos sistémicos y la respuesta inflamatoria.

Por otro lado, hay que destacar el trabajo de Beeheler y col²²⁴ que analizó el efecto de los retinoides sobre el factor de transcripción AP-1, en modelos experimentales de artritis. En este trabajo, se describió que en el modelo de ratón CIA y en el modelo de artritis inducida por la pared celular de estreptococos (modelos SCWA) en ratas, el tratamiento de los animales con la molécula BMS-189453, redujo la progresión de la enfermedad. Este fármaco, BMS-189453, es un agonista para los receptores RAR, pero no es capaz de activar la función transcripcional del mismo, aunque sí mantiene la actividad correpresora de RAR sobre AP-1. No obstante, los resultados sobre el factor de transcripción AP-1 son controvertidos. El estudio de Kirchmeyer y col²²⁵, demostró que el tratamiento de ATRA sobre FLS de rata *in vitro*, indujo la activación de AP-1 y de NF-IL-6, lo que llevó a la disminución de la expresión de IL-6 inducida por IL-1 β .

Además de los estudios en modelos animales de artritis, comentados anteriormente, Nozaki y col, estudiaron el efecto de ATRA sobre la producción de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica y en células T CD4⁺

de pacientes con AR y controles sanos. Los resultados mostraron que el tratamiento con ATRA suprimió la producción de TNF e IFN γ , en ambos grupos, pacientes con AR y controles sanos²²⁶.

El conjunto de los trabajos comentados anteriormente sugieren que la vía de señalización del ácido retinoico está implicada en la patogenia de la artritis, aunque todavía no está bien dilucidada y se desconoce el efecto de los retinoides sobre los sinoviocitos reumatoides. En este sentido, en un trabajo previo de nuestro laboratorio se observó un incremento de la expresión de CRABP2 en tejido articular de ratones artríticos, siete días después de la inducción de artritis en el modelo de transferencia de suero K/BxN⁵⁶. Otro estudio independiente, observó un incremento de la expresión de CRABP2 en tejido articular y líquido sinovial de ratones artríticos, a los días siete, doce y dieciocho tras la inyección del suero, en el mismo modelo murino²²⁷.





OBJETIVOS

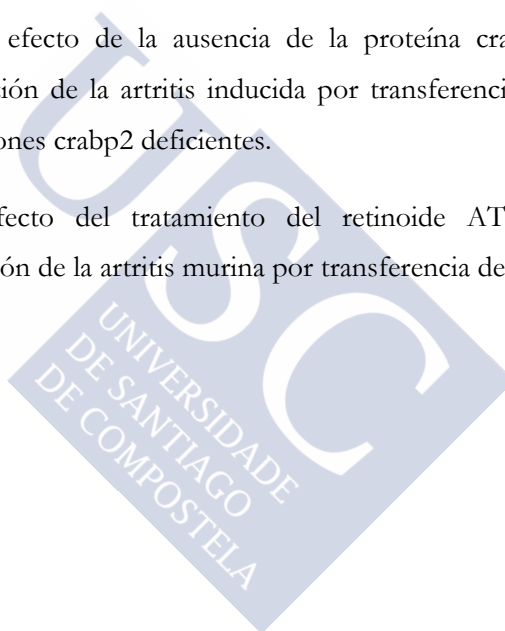


La AR es una enfermedad autoinmune que afecta a una fracción significativa de la población y ocasiona dolor e incapacidad a las personas que la padecen. La producción de mediadores inflamatorios son claves en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación articular que junto a la hiperplasia sinovial llevan a la destrucción progresiva de la articulación y a la incapacidad permanente. La llegada de los nuevos tratamientos biológicos dirigidos frente a citoquinas inflamatorias, células B o frente a moléculas implicadas en la activación de células T, han mejorado mucho el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, alrededor de un 30% de pacientes no responde a estas nuevas terapias o lo hacen parcialmente. Por ello, sigue siendo necesario profundizar en el conocimiento de todos los actores y mecanismos moleculares implicados en la patogenia de la AR, con el fin de identificar nuevas dianas terapéuticas.

Algunas nuevas dianas se podrían encontrar en la vía de señalización de los retinoides. En efecto, numerosos estudios han mostrado que los retinoides pueden ejercer un potente efecto antiproliferativo y proapoptótico, por lo que se están utilizando como agentes terapéuticos en distintos tipos de cáncer. Por otro lado, en los últimos años, se ha demostrado la importancia de los transportadores celulares del ácido retinoico, CRABP2 y FABP5, en la modulación de los efectos de los retinoides y, en el caso de CRABP2, en la regulación de la apoptosis con independencia del ácido retinoico. La implicación de la vía de señalización de los retinoides en el crecimiento celular y la apoptosis y el aumento de expresión del gen *crabp2* en tejido articular y líquido sinovial de ratones artríticos observado en estudios previos sugiere que la vía de señalización del ácido retinoico puede tener un papel importante en la patogenia de la artritis.

Los objetivos de esta tesis doctoral se resumen en:

1. Analizar el efecto del retinoide ATRA en los siguientes aspectos patogénicos de los sinoviocitos reumatoides: proliferación, apoptosis, migración, invasión y respuesta inflamatoria.
2. Estudiar la expresión de las proteínas transportadoras CRABP2 y FABP5 en sinoviocitos reumatoides.
3. Analizar el efecto de la ausencia de las proteínas transportadoras sobre las características patogénicas de los sinoviocitos reumatoides.
4. Determinar el efecto de la ausencia de la proteína crabp2 en el desarrollo y evolución de la artritis inducida por transferencia de suero con la ayuda de ratones crabp2 deficientes.
5. Estudiar el efecto del tratamiento del retinoide ATRA en el desarrollo y evolución de la artritis murina por transferencia de suero.





MATERIALES Y MÉTODOS



1. Cultivo Celular de FLS

Se obtuvieron FLS a partir de tejido sinovial de pacientes con AR, sometidos a sinovectomía o a reemplazamiento articular. Los pacientes con AR cumplían los criterios establecidos por ACR en 1987⁵ para la clasificación de la AR. El estudio se llevó a cabo conforme a las recomendaciones de la Declaración de Helsinki 2008 y la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, tras la aprobación por el Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo, con código de registro 2014/393.

El tejido sinovial fue triturado e incubado con 100µg/ml de colagenasa (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EEUU) en medio *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM; Lonza, Suiza) sin suero fetal bovino (FBS), durante 3h a 37°C. Las células se lavaron en medio de cultivo completo [DMEM, 10% FBS HyClone (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido) 1% penicilina/estreptomicina y 1% glutamina (ambos de Lonza)] y tras centrifugación a 1400 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y los FLS se resuspendieron en medio de cultivo completo y se sembraron en placas de seis pocillos, a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaron el 80-90% de confluencia, se tripsinizaron y dividieron con un ratio 1:3 en placas p100, y se utilizaron entre los pases 3 y 8 para todos los experimentos. Durante el mantenimiento de los FLS, el medio de cultivo completo se renovó cada 3 días. Para realizar los experimentos se retiró previamente el suero, 12h o 24h antes, como se indica en los distintos ensayos.

2. Ratones

En este trabajo se utilizaron ratones, C57BL/6J, *crabp2* deficientes, transgénicos KRN, NOD (non-obese diabetic mice) y los ratones que se obtuvieron del cruce de estos dos últimos, ratones K/BxN. Los ratones se mantuvieron en la sala libre de gérmenes patógenos (SPF) del animalario del Centro de Investigación de Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas de la Universidad de Santiago de Compostela (CIMUS), centro registrado con el número de REGA: ES150780275701, en cumplimiento de la normativa vigente en España (Real Decreto 53/2013), y bajo el número de autorización 15010/14/004. La persona responsable del trabajo con animales fue la doctora Carmen Conde Muro, directora de esta tesis doctoral.

Ratones *crabp2* deficientes: Los ratones deficientes en *crabp2*, fueron descritos por Lampron y col¹⁵³ y cedidos amablemente por Pierre Chambon del IGBMC (Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, Francia). Los ratones *crabp2*^{+/-} (con fondo mixto de C57BL/6J × 129Sv) se retrocruzaron más de 12 veces con ratones C57BL/6J (Charles River, Barcelona, España), con el fin de obtener ratones heterocigotos para *crabp2* en un fondo genético homogéneo C57BL/6J. Posteriormente, se realizaron cruces *crabp2*^{+/+} por *crabp2*^{+/-} para conseguir los tres genotipos: genotipo salvaje (*crabp2*^{+/+}), heterocigoto (*crabp2*^{+/-}) y deficiente en *crabp2* (*crabp2*^{-/-}).

Modelo de artritis experimental K/BxN: es un modelo de artritis espontánea descrito por Kouskoff y col²²⁸. Los ratones K/BxN se obtienen del cruce de ratones transgénicos para el receptor de células T (TCR) KRN y ratones NOD/LTJ que portan el alelo A^{g7} del MHC de clase II. Los ratones transgénicos KRN fueron cedidos amablemente por C. Benoist y D. Mathis [Harvard Medical School (Boston, MA, EEUU)] y los ratones NOD/LTJ fueron adquiridos a

Charles River. En estos ratones la glucosa 6-fosfato isomerasa (GPI) se presenta en el contexto del MHC II-Ag⁷ a las células T KRN, dando lugar a una respuesta inmune que produce anticuerpos artritogénicos, anti-GPI. La artritis en los ratones K/BxN comienza a las 3-4 semanas de edad y tiene características similares a la artritis humana, con formación de *pannus*, infiltrado celular, degradación del cartílago y hueso y remodelado óseo en estadios avanzados de la enfermedad. En el trabajo de esta tesis se ha utilizado el modelo K/BxN para la obtención del suero artritogénico necesario para el desarrollo de artritis por transferencia de suero. El suero procedente de los ratones K/BxN induce artritis en los ratones receptores, de características clínicas e histológicas comparables a la del modelo espontáneo, aunque es autolimitada. Esta variante tiene las ventajas de ser un modelo de inducción rápida y sencilla y en el que se consigue un 100% de incidencia de la enfermedad²²⁸.

3. Tipado de ratones mediante PCR

El análisis de los genotipos de los ratones *crabp2* deficientes y de ratones KRN, se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN obtenido de la cola de los ratones. Para ello, se digirieron los fragmentos de colas en tampón de lisis [100 mM Tris HCl pH 8.5, 5 mM de ácido etilaminotetraacético (EDTA), 0,2% SDS, 200 mM NaCl, 100 µg proteinasa K/ml (Sigma-Aldrich)] durante toda la noche a 55°C. Posteriormente el ADN se precipitó con isopropanol y se resuspendió en 10 mM Tris HCl, 0,1 mM EDTA pH 7,5 a una concentración final de 100 ng/µl. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 25µl que contenía 100ng de ADN. Las concentraciones de los reactivos y las condiciones de amplificación se detallan en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. Componentes y volúmenes utilizados en la PCR para el tipado de ratones CRABP2 y KRN.

Componentes de la PCR	$\mu\text{l}_{\text{final}}$ (<i>crabp2</i>)	$\mu\text{l}_{\text{final}}$ (KRN)
Tampón de PCR	1x	1x
BSA	0,1 mg/ml	-
MgCl ₂	-	3 mM
Betaína	-	0,5 M
dNTPs	20 μM	200 μM
Cebadores	6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cada uno	0,5 μM de cada uno
Taq ADN Polimerasa	0,5 U	0,5 U
H ₂ O mQ	Hasta completar volumen final	Hasta completar volumen final

Tabla 3. Condiciones de amplificación.

Ciclos de la PCR <i>crabp2</i>			Ciclos de la PCR KRN		
Desnaturalización	94°C- 3'	2 ciclos	Desnaturalización	95°C- 5'	30 ciclos
Desnaturalización	94°C – 1'		Desnaturalización	95°C – 1'	
Alineación	60°C – 1'		Alineación	60°C – 1'	
Extensión	72°C – 1'		Extensión	72°C – 1'	
Desnaturalización	94°C – 30''	30 ciclos	Extensión final	72°C – 5'	
Alineación	60°C – 30''				
Extensión	72°C – 30''				
Extensión final	72°C – 5'				

Para testar la ausencia o presencia del gen *crabp2* se emplearon los siguientes cebadores:

BAO235: AGGACTCAGCGTCCAGTGTT

XB7: TCCCAACTCACGAAAACCTC

AGN62: ATTAAGGGCCAGCTCATTC

Se realizaron dos reacciones de amplificación, una con los cebadores BAO235+XB7 que amplifica el alelo silvestre [155 pares de bases (pb)], y otra con los cebadores BAO235+AGN62 que amplifica el alelo deficiente (248 pb). Como se muestra en la figura 9, la amplificación únicamente con BAO235+XB7 confirma que se trata de un ratón silvestre ($^{+/+}$), la amplificación con BAO235+AGN62, de un ratón deficiente para *crabp2* ($^{-/-}$) y con ambos cebadores de un heterocigoto ($^{+/-}$). El tamaño de los fragmentos del ADN amplificado se testó en geles de agarosa al 2% en tampón TAE (40 mM Tris Base, 20 mM ácido acético, 10 mM EDTA, pH 8.4).

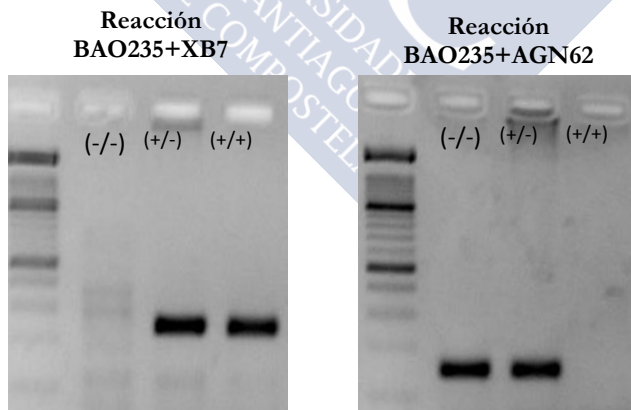


Figura 9. Resultado PCR tipado *crabp2*. Gel de agarosa que muestra los fragmentos de ADN amplificados para *crabp2* deficiente ($^{-/-}$), heterocigoto ($^{+/-}$) y silvestre ($^{+/+}$).

Los cebadores empleados para testar la presencia del gen transgénico KRN fueron:

TCR α R: GTATTGGAAGGGGCCAGAG

TCR α F: AGGTCCACAGCTCCTTCTGA

TCR β R: GAGCCTGGTTGTTTGTGGAT

TCR β F: GGGCAAAAAGTACCTTGAA

Se realizaron dos reacciones de amplificación, una con los cebadores TCR α R+TCR α F que amplifica el alelo de la cadena α del TCR (146 pb), y otra con los cebadores TCR β R+TCR β F que amplifica el alelo de la cadena β del TCR (277 pb). Así la amplificación de ambas bandas confirma que se trata de un transgénico KRN, que porta los linfocitos T con este receptor. El tamaño de los fragmentos del ADN amplificado se testó en geles de agarosa al 1% en tampón TAE. Un ejemplo se muestra en la figura 10.

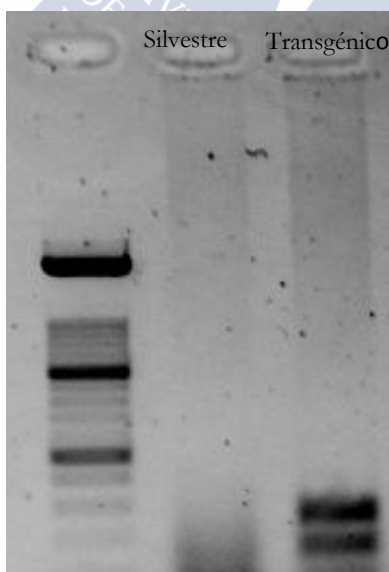


Figura 10. Resultado PCR tipado K/BxN. Gel de agarosa que muestra los fragmentos de ADN amplificados para un ratón transgénico K/BxN.

4. Inducción y evaluación de artritis en el modelo murino

Para la inducción de artritis, en primer lugar, se obtuvo suero artritogénico de ratones K/BxN entre las 4 y las 8 semanas de edad. Se mezclaron todos los sueros extraídos de varios ratones y se guardaron a -80°C hasta su uso. La artritis se indujo en ratones de entre 6 y 8 semanas de edad, mediante inyección intraperitoneal de 100 μl de suero de K/BxN, en los días 0 y 2.

Con el fin de analizar el papel de *crabp2* en la artritis murina, se indujo artritis en dos grupos de ratones. Un grupo con 12 ratones *crabp2*^{-/-} y otro con 6 ratones *crabp2*^{+/+} y 6 *crabp2*^{+/-}, como grupo control. Por otro lado, para el estudio del papel de ATRA en la artritis murina, se utilizaron dos grupos de 12 ratones C57BL6 cada uno. En el grupo experimental los 12 ratones se trataron diariamente con 6mg/Kg de ATRA, por vía intraperitoneal, desde el día 0 hasta el sacrificio a día 10. En el grupo control, 12 ratones C57BL6 fueron tratados con vehículo diariamente, desde el día 0 hasta el día 10. En ambos grupos la artritis fue inducida siguiendo el protocolo habitual. Cuando la inyección del tratamiento coincidió con la inyección del suero, el tratamiento se administró media hora antes que el suero.

La evolución clínica de la artritis se realizó en cada una de las cuatro extremidades por dos observadores independientes, en los días 0, 3, 6, 7, 8, 9 y 10 tras la inducción de artritis, utilizando la siguiente puntuación clínica semicuantitativa: 0 = ausencia de edema, 1= edema y eritema ligeros en el tobillo o muñeca, 2= edema y eritema moderados, 3= severo enrojecimiento e inflamación de tobillo o muñeca, 4= inflamación máxima con rigidez articular. La afectación de los dedos se cuantificó separadamente, se asignó 1 punto para 1 o 2 dedos afectados, 2 para 3 o 4, 3 para 5 o 6 y 4 para más de 7 dedos afectados. La puntuación máxima posible fue de 20 por ratón.

A día 10 se sacrificaron los ratones para la extracción de las articulaciones de las patas delanteras y traseras, mediante disección de la piel y musculatura.

5. Análisis histológico

Para el análisis histológico se decidió obtener las articulaciones del tobillo y pie derechos. Se fijaron en formol durante 6h y fueron descalcificadas en tampón fosfato salino (PBS), EDTA 0,5M sin calcio/magnesio, en nevera, cambiando el tampón cada dos días durante un periodo total de tres semanas. Las articulaciones se incluyeron en parafina y los bloques fueron cortados y teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) para la evaluación de la inflamación y la erosión ósea, y con O-safranina o azul de toluidina para la determinación del daño del cartílago. El grado de inflamación sinovial se estableció según la siguiente escala: 0= ausencia de inflamación, 1= engrosamiento sinovial e infiltrado ligero en “sublining”, 2=engrosamiento de la sinovia y moderado infiltrado en “sublining”, 3=marcado engrosamiento e infiltración sinovial, 4=severo engrosamiento e infiltrado sinovial. La degradación del cartílago se evaluó siguiendo una escala de 0 a 4: 0= ausencia de patología, 1= pérdida de metacromasia, 2= pérdida de proteoglicanos y ligera destrucción superficial, 3= destrucción que se extienda a la zona central, 4= destrucción del cartílago en todo su espesor. La destrucción ósea se valoró siguiendo una escala de 0 a 4: 0= ausencia erosión, 1= pequeñas áreas de erosión, 2= áreas más numerosas, 3= grandes zonas de erosión sin alteración de la estructura general, 4= gran destrucción con alteración de la estructura.

6. Tratamientos

Los tratamientos que se utilizaron en los distintos experimentos *in vitro* fueron, 0,5µg/ml de anticuerpo α Fas (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), 100ng/ml de FasL (Merck Millipore), 10ng/ml de TNF (Sigma-Aldrich), 1ng/ml de IL-1 β (Sigma-Aldrich), 2µg/ml de VCAM1 (Recombinant Human VCAM-1/CD106, ADP5-050, de R&D Systems), 10ng/ml de PTX3 (Recombinant Human Pentraxin 3/TSG-14, 1826-TS-025, de R&D Systems), 10ng/ml de CX3CL1 (Recombinant Human CX3CL1/Fractakine, 365-FR-025, de R&D Systems) y 5µM de ATRA (Sigma-Aldrich). Todas las diluciones se llevaron a cabo en medio de cultivo, excepto el tratamiento con ATRA, que previamente se diluyó en el vehículo DMSO; por este motivo la situación control de los tratamientos *in vitro* se realizó con 0,04625% de DMSO.

Para el estudio del efecto de ATRA en ratones el tratamiento se preparó de un modo distinto al utilizado *in vitro*. Se realizó una solución de reserva de 4mg/ml, según el siguiente esquema: 20 mg de ATRA y 0,7 ml de 0,1 N de NaOH se añadieron a una mezcla de etanol (3,5 ml) y Tween 80 (500 mg). La mezcla se sonicoó durante 3 min y el volumen se completó hasta 5 ml con agua destilada. Esta solución se guardó a -30°C. Las dosis de ATRA se prepararon inmediatamente antes de la administración, diluyendo en salino la solución reserva a 1mg/ml. Todos los recipientes con soluciones de ATRA se protegieron de la luz, con el fin de evitar su degradación, tanto para el tratamiento *in vitro* como *in vivo*.

7. Silenciamiento de los genes *CRABP2* y *FABP5* en sinoviocitos reumatoides

Mediante la técnica de transfección de ARN de interferencia (siARN) se suprimió la expresión de *CRABP2* y *FABP5* en FLS de pacientes con AR. Para llevar a cabo el silenciamiento se sembraron los FLS al 70% de confluencia, se utilizaron aproximadamente 14×10^4 células/pocillo en placas P6 o bien 7×10^5 células en placas P100 en medio DMEM con 10% FBS y 1% glutamina. Las células fueron transfectadas con 20nM del siARN correspondiente, siARN específico de *CRABP2* (ON-TARGET plus Human *CRABP2* siRNA-SMART pool), siARN específico de *FABP5* (ON-TARGET plus Human *FABP5* siRNA-SMART pool), o siARN control de la transfección (ON-TARGET plus Non-targeting Pool), todos ellos de Dharmacon (GE Healthcare Life Sciences). Las células fueron transfectadas en Opti-MEM (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU) utilizando 1.25µl/100µl (GE Healthcare Life Sciences). Después de 6h las células se cultivaron en DMEM 10% FBS, 1% glutamina y 1% penicilina/estreptomicina. Los experimentos se realizaron 96h después de la transfección, como se indica en los resultados de los distintos ensayos. La eficacia del silenciamiento se analizó mediante Western blot y qRT-PCR a las 24h y 96h de la transfección.

8. Ensayos de Apoptosis

Para analizar el efecto del tratamiento con ATRA, o de la ausencia de la proteínas CRABP2 o FABP5, sobre la apoptosis de los sinoviocitos reumatoides, se utilizaron dos técnicas, un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y un ensayo de luminiscencia. En el caso del estudio de la ausencia de *CRABP2* o *FABP5*, las células se sembraron 24h después del silenciamiento. Para

ambas técnicas, se sembraron 6×10^3 células/pocillo en placas 96-pocillos con DMEM, 10% FBS, 1% glutamina y 1% penicilina/estreptomicina. 24h después, las células fueron serodeprivadas durante 12h y tratadas con $0,5 \mu\text{g/ml}$ de α -Fas o 100ng/ml de FasL, durante 24h.

ELISA: La apoptosis se determinó mediante cuantificación de ADN mono- y oligonucleosomal usando un ELISA de detección de muerte celular (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Roche Diagnostics, Switzerland) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ensayo de luminiscencia: como método de confirmación se analizó la actividad de las caspasas 3/7 mediante el kit Caspase-Glo® 3/7 assay (Promega). Las células se incubaron durante una hora con el reactivo reconstituido de Caspase-Glo® 3/7 y la señal generada después del clivado del sustrato DEVD-aminoluciferina por la caspasa 3/7 se midió utilizando el lector de microplacas FluoStar Optima (BMG Labtech, Thermo Fisher Scientific).

9. Ensayo de proliferación

Para medir el efecto de ATRA sobre la proliferación de los sinoviocitos reumatoides, se cultivaron 2×10^3 células/pocillo, en placas P96, en DMEM, 5% FBS, 1% glutamina y 1% penicilina/estreptomicina. Después de 24h de cultivo, las células se trataron con $5 \mu\text{M}$ ATRA y se determinó la proliferación inducida a 24h, 48h, 72h y 96h, mediante el kit CellTiter-Glo Luminescent Viability Assay (Promega, Wisconsin, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante. La luminiscencia se midió usando un lector de microplacas FluoStar Optima (BMG Labtech, Thermo Fisher Scientific).

10. Ensayo migración

Con el fin de analizar el efecto de ATRA en la migración de los FLS, se utilizó un ensayo de migración con la ayuda de Ibidi Culture Inserts (Ibidi®, Martinsried, Germany). Cuando estos insertos de silicona se colocan sobre una superficie de cultivo celular, proporcionan dos depósitos separados por una pared de 500µm de espesor. En cada depósito se cultivaron 5000 células y se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia. Después el inserto de silicona se retiró de la superficie, dando lugar a dos regiones de células separadas por una zona de 500µm libre de células y éstas se trataron con 5µM de ATRA, 0,04625% DMSO (situación basal), TNF 10ng/ml y TNF+ATRA en medio DMEM, 1% FBS, 1% glutamina y 1% penicilina/estreptomicina. Se realizaron fotos a 0 y 96h tras el tratamiento y se cuantificó el área restante entre los dos depósitos, utilizando el Image J software (National Institutes of Health, EEUU). En la figura 11 se observa un esquema representativo de la técnica.

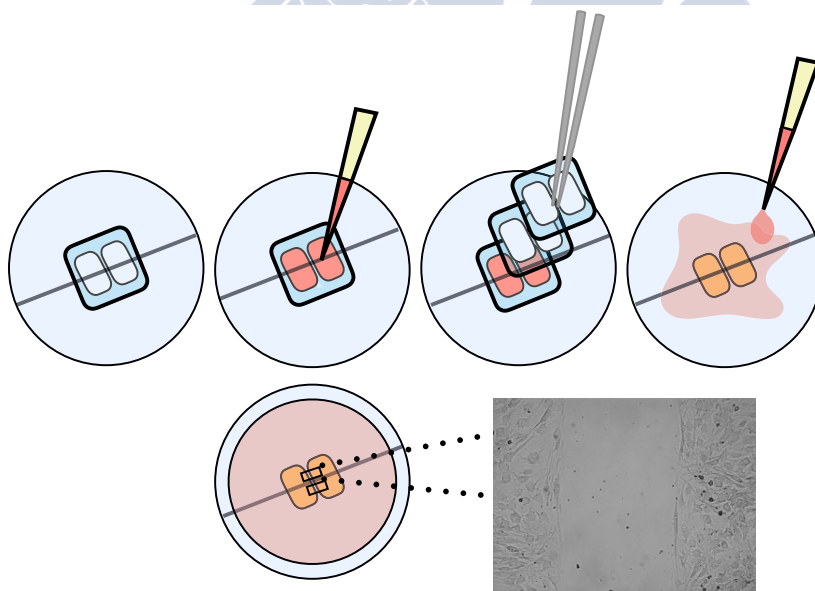


Figura 11: Esquema representativo del ensayo de migración. Imagen de autoría propia.

11. Ensayo invasión

Con el fin de analizar el efecto de ATRA en la capacidad de invasión de los FLS, se llevó a cabo un ensayo de invasión basado en el principio de la cámara Boyden. Este ensayo, introducido originalmente por Boyden²²⁹ para el análisis de la quimiotaxis de leucocitos, se basa en una cámara de dos compartimientos llenos de medio separadas por una membrana microporosa. En general, las células se colocan en el compartimento superior y se les permite migrar a través de los poros de la membrana en el compartimento inferior, en los que los agentes quimiotácticos están presentes. Después de un tiempo de incubación apropiado, la membrana entre los dos compartimientos se fija y se tiñe, y se determina el número de células que han migrado al lado inferior de la membrana (Figura 12).

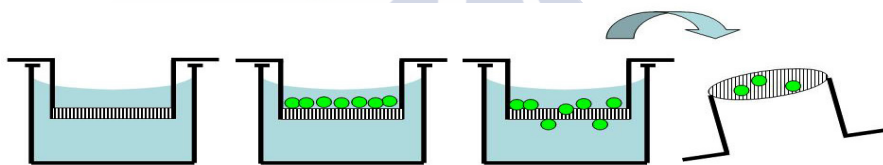


Figura 12: Esquema representativo del ensayo de invasión. Imagen tomada y modificada de Hulkower y col²⁸³, cedido por CC.

En nuestros ensayos se utilizó una cámara de plástico sellada en un extremo con una membrana porosa de 8 μm (Millicell®, Cell Culture Inserts, MILLIPORE). Dentro de esta cámara se simuló un entorno extracelular, mediante el uso de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de matriz Matrigel® (BD, Becton, Dickinson and Company Franklin Lakes, NJ, EEUU). Esta cámara se suspendió sobre un pocillo de placa p24, que contenía 500 μl de medio con FBS al 10%, y que actuó como quimioatrayente. En la cámara superior se añadieron 5×10^4 células en 200 μl de medio al 1% de FBS y con 5 μM de ATRA o 0,04625% de DMSO. A continuación, las placas se incubaron durante 48h a 37°C en 5% de CO₂. Las

células no invasoras se eliminaron mediante una torunda de algodón y las células invasoras se fijaron con 4% de paraformaldehído y se tiñeron con Giemsa. Se hicieron fotos de células invasoras presentes en 10 campos aleatorios, en el microscopio Axio Vert.A1 (Zeiss, Oberkochen, Alemania), con un aumento 20x y las imágenes se analizaron con el software Image J (National Institutes of Health, EEUU).

12. Ensayo de determinación de citoquinas en sobrenadante de células

Para analizar el efecto de ATRA sobre la respuesta inflamatoria de los FLS, se realizó un ensayo Bio-Plex Pro Human Chemokine Assay (Bio-Rad Laboratories, CA, EEUU). Se sembraron 10.000 células en pocillos p96, se serodeprivaron durante 16h y se trataron durante 24h con 5 μ M de ATRA, 10ng/ml de TNF, TNF+ATRA o 0,04256% DMSO como situación basal. Tras la incubación se recogieron los sobrenadantes y se congelaron a -20°C hasta su uso. Los sobrenadantes se utilizaron a una dilución 1:1,5 y el ensayo se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante.

13. Extracción de ARN

El ARN total de las células cultivadas se obtuvo mediante microcentrifugaciones en columna, utilizando el kit de extracción Speedtools total RNA extraction Kit (Biotools, Madrid, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones del ARN extraído se midieron en un espectrofotómetro NanoDrop (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific).

14. Arrays

PrimePCR Assay, FAS signaling cascades (Bio-Rad Laboratories):

Se analizó la expresión de 45 genes relacionados con la vía apoptótica de Fas en sinoviocitos reumatoides deficientes en *CRABP2*, utilizando el PrimePCR Assay, FAS signaling cascades (Bio-Rad Laboratories). Se cultivaron 7×10^5 células/pocillo de FLS en placas p100 y se silenciaron con siARN *CRABP2* o siARN control, como se ha detallado previamente. Después las células se cultivaron en medio de serodeprivación durante 12h (DMEM 1% FBS, 1% glutamina y 1% penicilina/estreptomicina), y posteriormente se trataron con 0,5µg/ml de α -Fas durante 12h adicionales. Posteriormente, el ARN total fue extraído y 5µg se retrotranscribieron utilizando el kit iScript advanced cDNA synthesis (Bio-Rad Laboratories), según las instrucciones del fabricante. Un total de 60 ng de cADN por muestra y por reacción, se mezclaron con el SsoAdvanced™ SYBR® Green supermix, en los pocillos que contenían los primers y se realizó la qRT-PCR. Los datos brutos del array se procesaron y analizaron usando PrimePCR Analysis Software (Bio-Rad Laboratories) con un umbral de cambio 1,4 veces para la sobreexpresión y 2 veces para la disminución de la expresión.

Microarray SurePrint G3 8x60K v3 ID: 072363 (de Agilent Technologies, CA, EEUU):

Con el fin de analizar el efecto del tratamiento con ATRA sobre la expresión génica de sinoviocitos reumatoides, se realizó un microarray de expresión génica, de genoma completo, que incluye sondas para más de 26.000 genes únicos: SurePrint G3 8x60K v3 ID: 072363 (de Agilent Technologies, CA, EEUU). Para ello, FLS de pacientes con AR se trataron durante 12h con 0,04625% de DMSO (situación basal), 5µM de ATRA, 10ng de TNF o el

tratamiento combinado TNF+ATRA. Posteriormente, se procedió a la extracción de ARN total como se describe en el apartado 13 y las muestras se enviaron a la Unidad de expresión génica del servicio de genómica de la Universidad del País Vasco, encargada de la realización del microarray de un color, que de forma resumida se realizó como se describe a continuación. En primer lugar se cuantificaron las muestras de ARN en el espectrofotómetro UV/VIS NanoDrop 1000 (Thermo Fisher) y se analizó su calidad con la tecnología de Lab-chip, en el Agilent 2100 Bioanalyzer. Un μg del ARN total de cada tratamiento fue amplificado y marcado con Cy3-CTP utilizando el kit “Low Input Quick Amp Labeling kit, One-Color” de Agilent, de acuerdo con las especificaciones del fabricante, obteniéndose ARN complementario (ARNc). Después del marcaje, 600ng de ARNc se hibridaron en una cámara de hibridación “Sure hybridization chambers” (Agilent Technologies), durante 19h a 10 rpms en el horno de hibridación de Agilent. Tras la hibridación se escaneó el microarray utilizando el escáner de DNA microarrays G2565CA, de Agilent, Scan control Software versión 8.5.1, con un protocolo por defecto para el perfil definido: AgilentG3_GX_1Color. Se extrajeron los datos de la fluorescencia de las sondas a partir de la imagen escaneada del microarray, mediante el uso del software Agilent Feature Extraction software (ver. 10.7.3.1) (Agilent).

Para analizar el resultado del array, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento funcional, *Preranked* GSEA, (Gene Set Enrichment Analysis) con la ayuda de la aplicación GSEA/MSigDB (Broad Institute y UC San Diego). Para ello, se ordenaron los resultados del array utilizando el método *Rank Product* (RP) con la herramienta on-line: <http://strep-microarray.sbs.surrey.ac.uk/RankProducts/>. Con este método se obtuvieron dos listas por cada comparativa, una que describía los genes que aumentan su expresión en el tratamiento frente al control, y otra que recogía los genes que disminuían. Una vez obtenidos los resultados ordenados en base al RP, se realizó

el GSEA *Preranked* y se compararon nuestros resultados del array, con la base de datos Hallmark. Los resultados mostraron las vías que se encontraban significativamente enriquecidas para cada comparativa. Sólo se han tenido en cuenta aquellas rutas con un valor de enriquecimiento normalizado (NES)>3, un p valor nominal (NOM p-value)<0,01, una tasa de falso descubrimiento (FDR)<0,01 y con una probabilidad de que al menos ocurra un falso positivo, también conocida como family-wise error rate (FWER)<0,05. En los experimentos de validación, se seleccionaron los genes que apareciendo en el primer decil de la lista en las vías enriquecidas fueron de interés por su relación con migración, invasión, inflamación o artritis.

15. PCR en tiempo real con transcriptasa inversa (qRT-PCR)

Se analizaron los niveles de expresión de ARNm de diferentes genes en FLS tras silenciamiento o tras tratamientos mediante la qRT-PCR. La PCR en tiempo real se realizó a partir de 50 ng de ARN por muestra y por reacción, en duplicado, utilizando los reactivos 1-Step Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QRT-PCR, en un Stratagene Mx3005P (ambos de Aligent Technologies) o bien en un RotorGen (Corbett, Thermo Fisher Scientific). Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de 10 minutos a 50°C, 1 ciclo de 3 minutos a 95°C, 40 ciclos de 20 segundos a 95°C y 20 segundos a 60°C. Los niveles de expresión de los genes se cuantificaron mediante el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando como control de normalización el gen de la β -actina o el gen de la TATA Box Binding Protein (TBP), donde:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen}} - Ct_{\beta\text{-actina o TBP}}$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gen}} - Ct_{\beta\text{-actina o TBP}})_{\text{NT o situación basal}} - (Ct_{\text{gen}} - Ct_{\beta\text{-actina o TBP}})_{\text{siARN o tratamiento}}$$

Para los sinoviocitos tratados o silenciados, el valor $2^{-\Delta C_t}$ indica la expresión del gen relativa a la expresión de un control de carga (β -actina o TBP) y el valor $2^{\Delta\Delta C_t}$ indica el incremento o disminución de la expresión del gen respecto a la situación basal o no transfectada (NT). El valor de $\Delta\Delta C_t$ en situación basal o no transfectada (NT) se determinó como igual a 0, y $2^0 = 1$. Los cebadores utilizados para la comprobación de los resultados del microarray, se muestran en la tabla 4, las secuencias se obtuvieron de la base de datos PrimerBank y fueron sintetizados por Sigma-Aldrich. Para comprobar la expresión de *CRABP2* o *FABP5* en situación basal, o tras los ensayos de silenciamiento se utilizaron los cebadores para *CRABP2* humano, *FABP5* humano y *ACTINA* humano (QIAGEN, Hilden, Alemania).

Tabla 4. Descripción del conjunto de cebadores utilizados para la comprobación del microarray.

GEN	CEBADOR sentido	CEBADOR antisentido
CX3CL1	ACCACGGTGTGACGAAATG	TGTTGATAGTGGATGAGCAAAGC
CXCL3	TGGTCACTGAACTGCGCT	ATGCGGGGTGAGACAAG
EPSTI1	AGCAGGAGCTGGCCAACCTGGA	TTGTGGGCCACAAACAGCACT
VCAM1	GGGAAGATGGTCGTGATCCTT	TCTGGGGTGGTCTCGATTTTA
PTX3	TTATTCCCAATGCGTTCCAAGA	GCACTAAAAGACTCAAGCCTCAT
NOD2	CACCGTCTGGAATAAGGGTACT	TTCATACTGGCTGACGAAACC
MMP1	CTCTGGAGTAATGTCACACCTCT	TGTTGGTCCACCTTTCATCTTC
IL-1β	AGCTACGAATCTCCGACCAC	CGTTATCCCATGTGTGGAAGAA
ST3GAL5	AGGAATGTCGTCCCAAGTTTG	GGAGTAAGTCCACGCTATACCT
CXCL9	CCAGTAGTGAGAAAGGGTCGC	AGGGCTTGGGGCAAATTGTT
TBP	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGTCCCCACCA

16. Extracción de proteínas

El procedimiento de extracción de proteína a partir de células en cultivo se inició mediante el lavado con PBS frío, seguido del tratamiento con 6,7 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de tampón de lisis (50mM Tris HCl [pH7,5], 250mM NaCl, 1% Triton X-100, 30mM Na₄P₂O₇, 5mM EDTA [pH 8,0], 100mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina, y 1mM fluoruro de metilfenilsulfonilo). En presencia del tampón de lisis, se lisaron las células con ayuda de un raspador celular. El lisado se mezcló en un agitador tipo vórtex y tras 30 minutos de reposo en hielo se centrifugó a 13000g durante 15 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se conservó a -20°C. La concentración de proteínas se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad Laboratories), siguiendo las instrucciones del fabricante.

17. Western Blot

Las proteínas (20 μg) se separaron según el peso molecular mediante una electroforesis en un gel SDS-PAGE de entre el 8 y el 12% de acrilamida. Al término de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas PVDF (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) mediante un sistema de transferencia húmeda Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad Laboratories) durante 1 hora a un amperaje constante de 0,28 A. Después la membrana se bloqueó para evitar uniones inespecíficas, con leche desnatada en polvo 5% disuelta en TBS-T (150 mM NaCl, 20 mM Tris Base, pH 7,6 y 0,1 % de Tween-20) durante 1 hora en agitación continua.

Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario a 4°C toda la noche en agitación continua. Los anticuerpos utilizados se muestran en la tabla 5. Después, se realizaron lavados para eliminar el anticuerpo primario

sobranante y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-rabbit o anti-mouse ambos de Santa Cruz Biotechnology). El anticuerpo secundario va acoplado a una peroxidasa de rábano que permite la detección de la banda mediante revelado con un sustrato quimioluminiscente, Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) en el sistema UVP EC3 Imaging System (UVP, EEUU).

Tabla 5. Anticuerpos usados en el Western Blot.

PROTEÍNA	ANTICUERPO
CRABP2	Amablemente proporcionado por Cécile Rochette-Egly, Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, Illkirch, Francia
FABP5	MAB3077 Clone #311215 Human FABP5 (R&D SYSTEMS, MN, EEUU)
MAP3K5	ASK1 sc-5294 (Santa Cruz Biotechnology, TX, EEUU)
JNK	JNK sc-7345 (Santa Cruz Biotechnology)
pJNK	p-JNK sc-6254 (Santa Cruz Biotechnology)
ERK	ERK sc-93 (Santa Cruz Biotechnology)
ACTINA (Control de carga)	AC-74, (Sigma-Aldrich)

18. Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos experimentales se analizaron mediante test no paramétricos, U de Mann-Whitney o Wilcoxon de datos pareados. Para el análisis del efecto de los tratamientos en la proliferación, se utilizó el test ANOVA de medidas repetidas.

Valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando al programa GraphPAD Prism version 5.00 para Windows (GraphPAD Software, San Diego CA).



RESULTADOS



1. Efecto de ATRA en la proliferación y apoptosis de los sinoviocitos reumatoides

Distintos trabajos han demostrado en diferentes tipos celulares tumorales un efecto antiproliferativo y proapoptótico del ácido retinoico. Teniendo en cuenta las características “pseudotumorales” de los sinoviocitos reumatoides, existe la posibilidad de que los retinoides modifiquen su capacidad proliferativa y su resistencia a la apoptosis. Por lo tanto, se analizó el efecto de ATRA sobre la proliferación durante 96 h en FLS de pacientes con AR. Contrariamente a lo esperado no se observaron cambios significativos en ninguno de los cuatro tiempos estudiados, ni en el análisis conjunto de la curva de proliferación, a pesar de haber incluido en el estudio 11 líneas de diferentes pacientes.

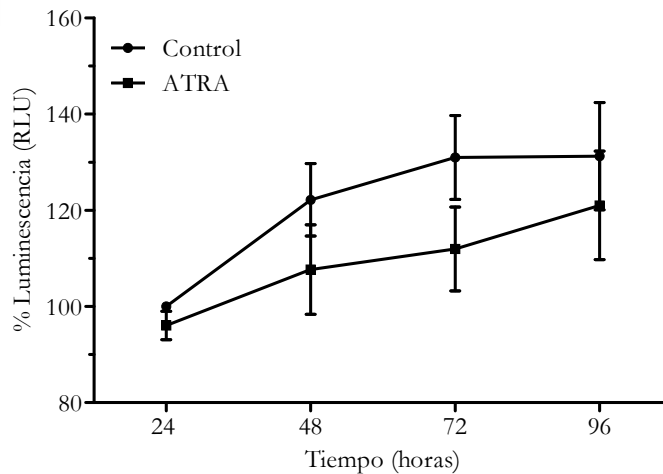
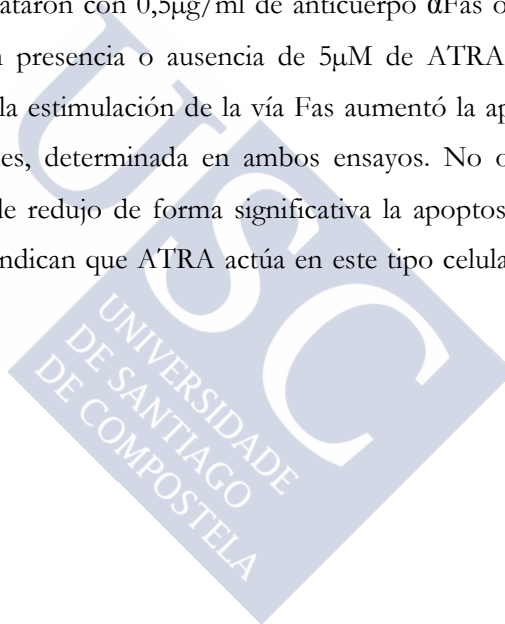


Figura 13. Ausencia de efecto del retinoide sobre la proliferación espontánea de FLS reumatoides. Proliferación de FLS de pacientes con AR inducida en presencia o ausencia de 5 μ M de ATRA. Los valores representan el porcentaje del control y son la media \pm error estándar de la media (ESM) de 11 líneas de FLS diferentes. La luminescencia obtenida para controles no tratados a las 24h se consideró el 100%. Las diferencia entre el tratamiento de ATRA *versus* el control se analizaron mediante el test de ANOVA de medidas repetidas.

Por otro lado, se decidió estudiar el efecto del retinoide sobre la apoptosis espontánea de los FLS de pacientes con AR. Se utilizaron dos metodologías para estudiar la apoptosis de los sinoviocitos reumatoides, un ELISA que medía la liberación de oligonucleosomas y un ensayo de luminiscencia que determinaba la actividad de la caspasa 3/7. Como se observa en la Figura 14A, ambas técnicas mostraron que el ATRA no aumentó la muerte celular programada, si no que indujo una disminución de la misma. Posteriormente se analizó el efecto de ATRA en la apoptosis inducida mediante la señalización de Fas. En este experimento, los FLS se trataron con 0,5µg/ml de anticuerpo α Fas o 100ng/ml de mFasL durante 24h en presencia o ausencia de 5µM de ATRA. Como se muestra en la Figura 14B, la estimulación de la vía Fas aumentó la apoptosis de los sinoviocitos reumatoides, determinada en ambos ensayos. No obstante, el tratamiento con el retinoide redujo de forma significativa la apoptosis inducida por Fas. Estos resultados indican que ATRA actúa en este tipo celular como un factor de supervivencia.



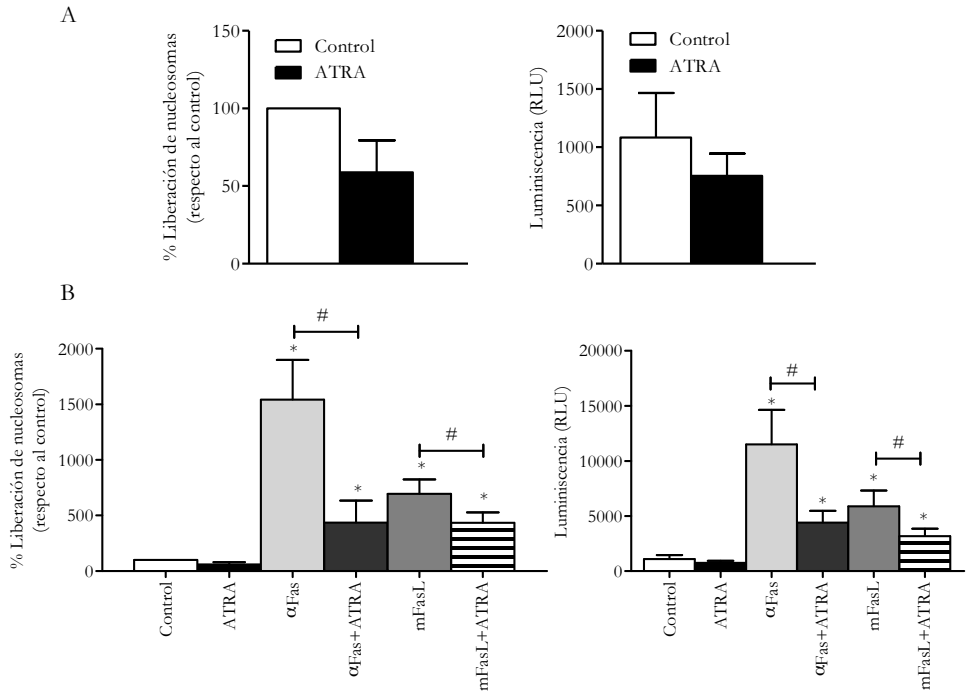


Figura 14. ATRA aumenta la resistencia de los sinoviocitos reumatoides a la apoptosis inducida por Fas. Las gráficas muestran la apoptosis espontánea (A) o inducida por Fas (B) de FLS reumatoides después de la estimulación con 5 μ M de ATRA (A), 5 μ M de ATRA+ α Fas (0,5 μ g/ml) o 5 μ M de ATRA+mFasL (100ng/ml). En los paneles de la izquierda se representa el porcentaje de liberación de nucleosomas tras el tratamiento relativo al valor obtenido en ausencia de tratamiento (control) que se consideró el 100%. El análisis de la actividad de la caspasa 3/7 medida como unidades de luminiscencia relativa (RLU) se muestra en los paneles de la derecha. Los valores son la media \pm ESM de FLS de 6-8 pacientes con AR. # indica p<0,05 y * indica p<0,05 frente al control (Wilcoxon de datos pareados).

2. Análisis de la expresión de CRABP2 y FABP5 en sinoviocitos reumatoides

La ausencia de efecto de ATRA sobre la proliferación y apoptosis de los sinoviocitos reumatoides podría estar relacionada con la expresión de las proteínas transportadoras CRABP2 y FABP5 en estas células. Por ello, se analizó

la expresión de ARNm de *CRABP2* y *FABP5* en FLS de 7 pacientes con AR, mediante PCR en tiempo real. Como se muestra en la Figura 15A, los ARNm para ambas proteínas se expresan en FLS de pacientes con AR, aunque la expresión de *CRABP2* fue predominante. Resultados similares fueron obtenidos en el análisis de expresión de ambas proteínas mediante Western Blot (Figura 15B). Estos resultados excluyen la implicación de la ratio *CRABP2*/*FABP5* en la resistencia a la apoptosis observada tras el tratamiento con ATRA.

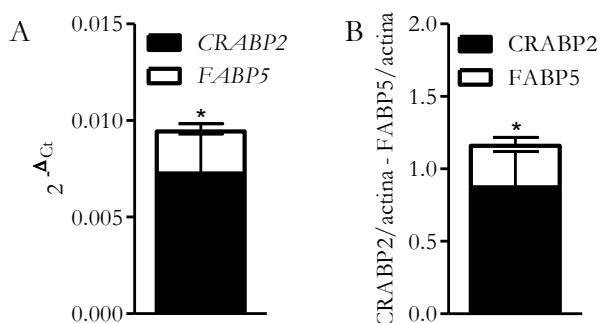


Figura 15. El ratio *CRABP2*/*FABP5* es elevado en sinoviocitos reumatoides. A. Niveles de ARNm para *CRABP2* y *FABP5* con respecto a la β -ACTINA ($2^{-\Delta C_t}$). **B.** La expresión de la proteína *CRABP2* y *FABP5* se evaluó mediante Western Blot, usando como control de carga la β -ACTINA. Los resultados son la media \pm ESM de FLS de 7 pacientes con AR diferentes. * indica $p < 0,05$ frente al control (Wilcoxon de datos pareados).

3. La ausencia de *CRABP2* sensibiliza a los sinoviocitos reumatoides a la apoptosis inducida por Fas

La falta de concordancia entre el ratio *CRABP2*/*FABP5* y los resultados observados en sinoviocitos reumatoides tratados con ATRA, puede deberse a un cambio en la asociación de estas proteínas transportadoras con la señalización de la apoptosis. Por este motivo se analizó el efecto del silenciamiento de *CRABP2* y *FABP5* en la apoptosis inducida por Fas en FLS. El silenciamiento de estos genes se realizó mediante la transfección de FLS reumatoides con siARN

específico para *CRABP2*, *FABP5* o siARN control. La eficiencia del silenciamiento se analizó determinando la expresión de ARNm de *CRABP2* y *FABP5* mediante PCR en tiempo real. La transfección con siARN de *CRABP2* redujo más del 90% la transcripción del gen (Figura 16A); y el silenciamiento de *FABP5* redujo un 72% su expresión (Figura 16B).

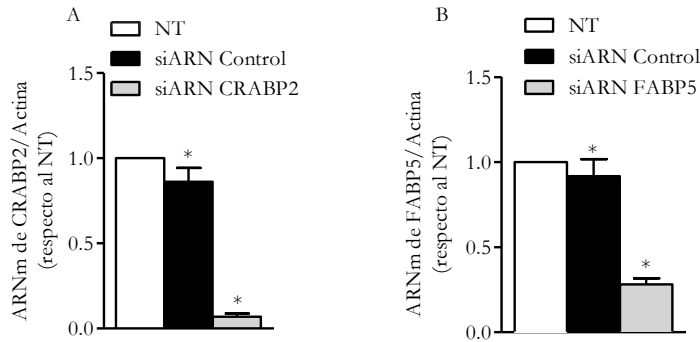


Figura 16. Análisis de la eficacia del silenciamiento. Expresión del ARNm para *CRABP2* (A) o *FABP5* (B) con respecto a la expresión de β -ACTINA. Los valores representan la media \pm ESM de FLS de 6 pacientes con AR. * indica $p < 0.05$ frente al control (Wilcoxon de datos pareados).

Posteriormente, los sinoviocitos silenciados se estimularon con 0,5 μ g/ml de anticuerpo α Fas o 100ng/ml de mFasL durante 24 horas y se determinó la apoptosis mediante cuantificación de la liberación de los oligonucleosomas y la actividad de la caspasa 3/7. Como se observa en la Figura 17A, el silenciamiento de *CRABP2* aumentó significativamente la liberación de oligonucleosomas en sinoviocitos reumatoides tras estimulación con α Fas, que fue tres veces superior a la observada en FLS transfectados con siRNA ($p=0,0039$). Cuando se determinó la apoptosis tras el tratamiento con mFasL, se observaron resultados similares ($p=0,0078$) (Figura 17A). Por el contrario, el silenciamiento de *FABP5* aumentó la resistencia a la muerte celular de FLS reumatoides estimulados con α Fas (Figura 17A, $p=0,0313$). Sin embargo, esta reducción fue menor y no alcanzó la significación estadística tras el tratamiento con mFasL (Figura 17A). El

análisis del efecto de ATRA en ausencia de CRABP2 o FABP5 incrementó la resistencia a la apoptosis en los sinoviocitos reumatoides en ambos casos. En efecto, en ausencia de CRABP2 el retinoide redujo la apoptosis en un 50% en FLS controles y tratados, aunque se mantuvo la apoptosis incrementada por la ausencia del transportador CRABP2 (Figura 17A). Los resultados obtenidos tras el silenciamiento de *CRABP2* se confirmaron mediante la determinación de la actividad de caspasa 3/7 (Figura 17B).

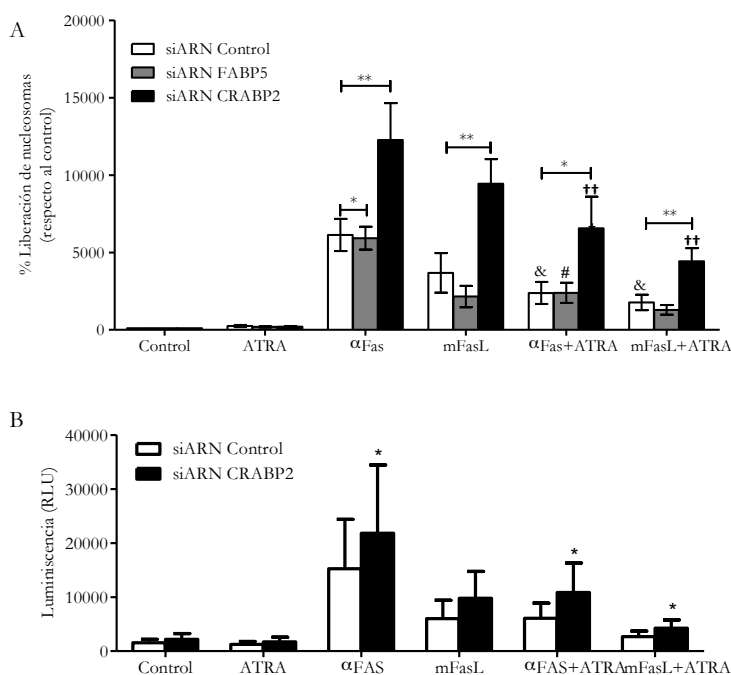


Figura 17. La supresión de *CRABP2* sensibiliza a los FLS reumatoides a la apoptosis inducida por Fas. Niveles de apoptosis en FLS de pacientes con AR después del tratamiento con 5 μ M de ATRA y la estimulación con 0,5 μ g/ml de α Fas o 100ng/ml de mFasL. La apoptosis se determinó cuantificando la liberación de nucleosomas mediante ELISA y se representa el valor relativo al obtenido en el grupo control (**A**). **B**. Análisis del nivel de apoptosis mediante la cuantificación de la actividad de caspasa 3/7. Los valores son la media \pm ESM de FLS de 7-9 pacientes con AR. * indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$, #, & indica $p < 0,05$ o †† $p < 0,01$ frente al tratamiento α Fas para cada silenciamiento respectivamente (Wilcoxon de datos pareados).

4. La deficiencia de *CRABP2* sensibiliza a los sinoviocitos reumatoides a la apoptosis mediante la sobreexpresión de ASK1, de pJNK y la represión de ERK

Para identificar los mecanismos responsables de la sensibilización a la apoptosis inducida por Fas de sinoviocitos reumatoides deficientes en *CRABP2*, se realizó un análisis de expresión de 45 genes relacionados con la apoptosis inducida por Fas. FLS de pacientes con AR, silenciados para *CRABP2* y controles fueron estimulados con 0,5µg/ml de anticuerpo α Fas durante 12h, tiempo tras el cual se extrajo el ARN y se realizó el array. Como se observa en el Volcano plot (Figura 18A) los genes que mostraron un cambio de expresión de $\geq 1,5$ veces, con un p valor $< 0,05$ se consideraron genes expresados diferencialmente. Estos genes fueron ASK1 que aumentó su expresión en células silenciadas para *CRABP2* en comparación con el silenciamiento control ($p=0,0064$) y ERK que la disminuyó ($p=0,0004$). Para el resto de los genes del array no se observaron cambios de expresión significativos. La expresión diferencial de ASK1 y ERK se confirmó mediante Western Blot en ambos casos. Como se muestra en la Figura 18B, la estimulación con α Fas en FLS deficientes en *CRABP2* aumentó un 49% la expresión de ASK1 y redujo un 27% la expresión de ERK1/2 (Figura 18C) cuando se comparó con FLS transfectados con siARN control. Puesto que en la apoptosis iniciada por los receptores de muerte, ASK1 se activa y, a su vez, activa a la MAPK, JNK, hemos analizado el nivel de fosforilación de esta quinasa en nuestras células. Los resultados mostraron que el tratamiento con α Fas aumentó significativamente el nivel de fosforilación de JNK en sinoviocitos reumatoides tras el silenciamiento de *CRABP2*. (Figura 18D, $p=0,0313$).

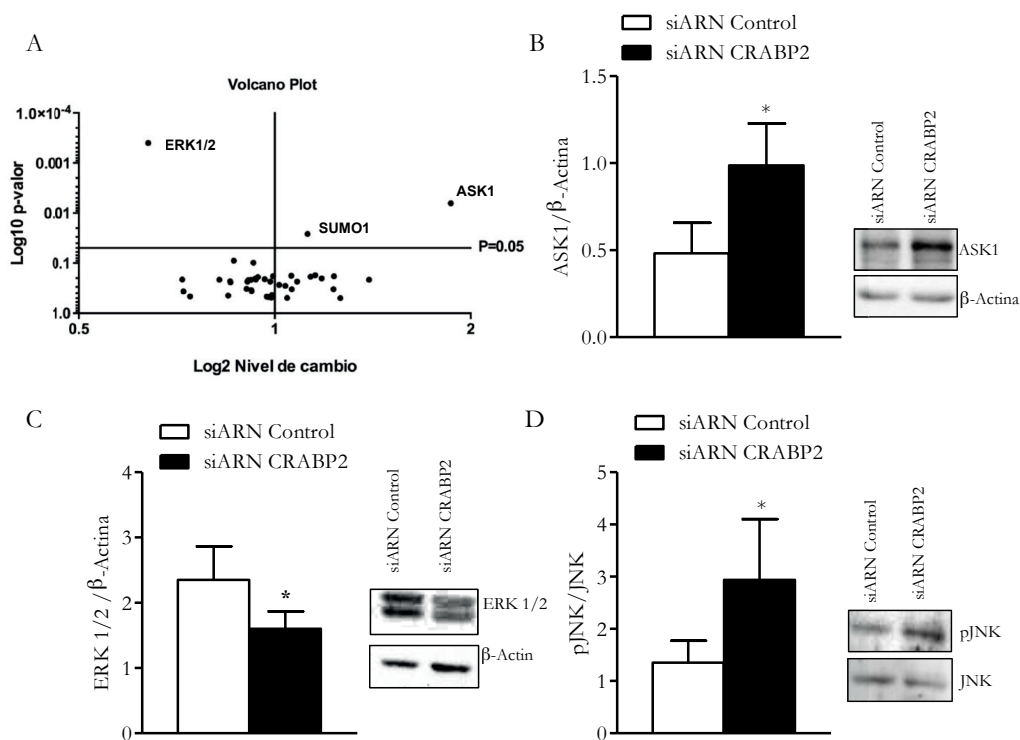


Figura 18. El silenciamiento de *CRABP2* aumenta la expresión de ASK1 y la actividad de JNK y reduce la expresión de ERK1/2. (A) Volcano plot que representa la expresión diferencial de los genes. Cuantificación densitométrica de la intensidad de banda del Western Blot para ASK1 (B), ERK1/2 (C) y pJNK/JNK (D) con imágenes de blots representativos a la derecha. Los valores son la media \pm ESM de 5-7 pacientes con AR.* indica $p < 0,05$ (Wilcoxon de datos pareados).

5. Efecto de los mediadores inflamatorios en la apoptosis inducida por Fas en sinoviocitos reumatoides deficientes en *CRABP2*

Dado el comportamiento no convencional de los sinoviocitos reumatoides, nos planteamos la posibilidad de que el ambiente inflamatorio, pudiera interferir con el potencial efecto beneficioso del silenciamiento de *CRABP2* en la apoptosis de los FLS reumatoides. Para analizar esta posibilidad,

indujimos apoptosis mediante tratamiento con α Fas en los FLS reumatoides transfectados con siARN de *CRABP2* o Control en presencia de TNF o IL-1 β , ambos medidores inflamatorios claves en la AR. Como se muestra en la Figura 19, el tratamiento con TNF redujo un 20% la muerte celular inducida por Fas en FLS deficientes en *CRABP2* y se observó una mayor reducción aún, después de la estimulación con IL-1 β (29%). Esta reducción es similar a la observada en células con silenciamiento control, lo que sugiere que las dos citoquinas promueven una resistencia a la apoptosis independiente de la función de *CRABP2*.

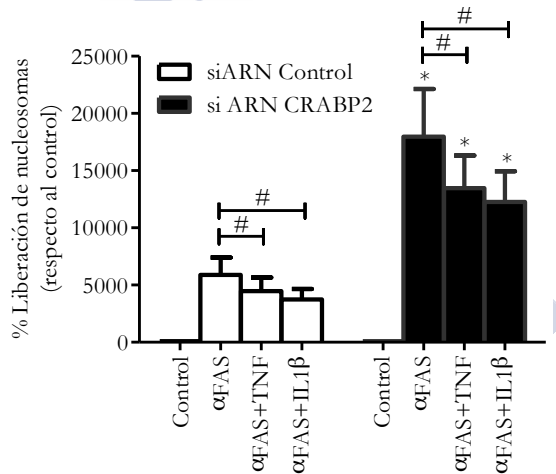


Figura 19. Los mediadores inflamatorios TNF o IL-1 β revierten parcialmente la sensibilización a la apoptosis inducida por Fas en FLS reumatoides deficientes en *CRABP2*. Apoptosis determinada mediante cuantificación de nucleosomas liberados en FLS reumatoides silenciados con siARN *CRABP2* o Control tras la estimulación con α Fas después del pretratamiento con 10ng/ml de TNF o 1ng/ml de IL-1 β . Los valores son la media \pm ESM de 6 pacientes con AR. # indica $p < 0,05$ y * indica $p < 0,05$ frente al control (Wilcoxon de datos pareados).

6. El tratamiento con ATRA inhibe la capacidad de invasión de los sinoviocitos reumatoides

Diversos estudios han demostrado el efecto beneficioso de ATRA sobre el control de la migración e invasión de distintos tipos celulares. Con el fin de analizar si este retinoide puede interferir en la capacidad invasiva de los sinoviocitos reumatoides, se realizó un ensayo basado en el principio de la cámara de Boyden, como se describe en el apartado de materiales y métodos. Explicado brevemente, las células de 9 pacientes con AR se sembraron en DMEM al 1% FBS con 5 μ M de ATRA o 0,04625% de DMSO (control), sobre la celdilla tapizada con Matrigel y se cultivaron durante 48h para permitir la invasión. Transcurrido este tiempo las células invasivas se tiñeron con Giemsa y se contabilizaron, con la ayuda del programa Image J. Los resultados del ensayo mostraron que los sinoviocitos tratados con ATRA invadieron alrededor de un 31% menos que los controles no tratados (Figura 20A, $p=0,018$).

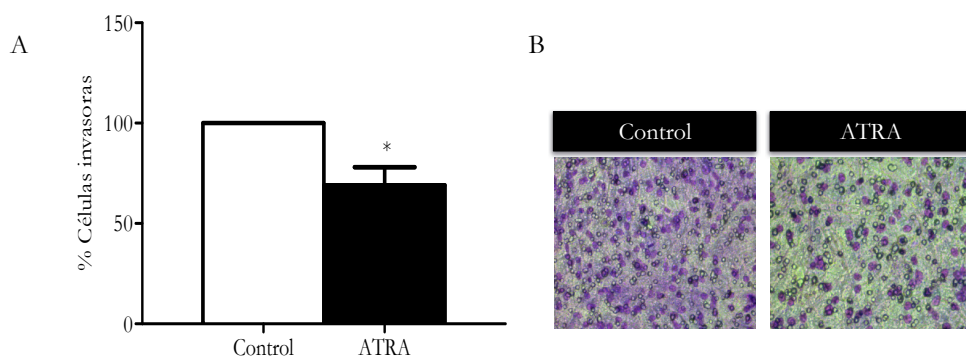


Figura 20. El tratamiento con ATRA reduce la capacidad de invasión de los FLS reumatoides. A. Porcentaje de células invasoras tras el tratamiento de 5 μ M ATRA con respecto al control. **B.** Imágenes representativas teñidas con Giemsa, de los grupos control y tratamiento con ATRA. Los valores son la media \pm ESM de 9 pacientes con AR. *indica $p<0,05$ frente al control (Wilcoxon de datos pareados).

Dado que ATRA redujo significativamente la capacidad de invasión de los sinoviocitos reumatoides, nos planteamos si la alteración en la migración de estas células podría contribuir al efecto observado. Se analizó la migración de sinoviocitos de pacientes con AR mediante un ensayo de “cierre de herida”, utilizando insertos de silicona de Ibidi®, como se explica en el apartado de materiales y métodos. Los sinoviocitos reumatoides se sembraron en los insertos y una vez alcanzado el nivel de confluencia, los insertos se retiraron y las células se trataron con 5 μ M de ATRA o vehículo (0,04625% DMSO), se fotografió la herida inicial y a las 96h, y se cuantificó el espacio ocupado por los sinoviocitos reumatoides mediante Image J. Los datos mostraron que el retinoide disminuyó en un 46% la migración de los FLS en comparación con los controles no tratados (Figura 21A, $p=0,004$).

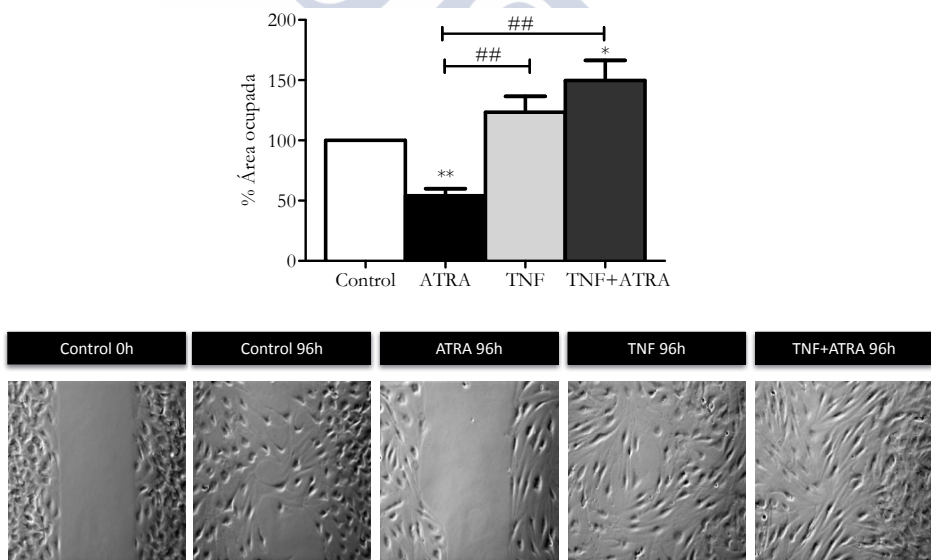


Figura 21. El tratamiento con ATRA reduce la migración de los sinoviocitos reumatoides.

A. Porcentaje de área ocupada por FLS de pacientes con AR tras 96h de tratamiento con 5 μ M de ATRA, 10ng/ml de TNF, o TNF+ATRA, con respecto al control, que se consideró el 100%. **B.** Imágenes representativas a tiempo 0 y 96h. Los valores son la media \pm ESM de 9 pacientes con AR. ## indica $p<0,01$, * indica $p<0,05$ frente al control y ** $p<0,01$ frente al control (Wilcoxon de datos pareados).

Puesto que se ha descrito que el TNF induce migración en FLS de pacientes con AR²³⁰, se decidió analizar el efecto de ATRA sobre la migración inducida por TNF en sinoviocitos de pacientes con AR. Para ello se trataron las células con 10ng/ml de TNF o el tratamiento combinado 5μM de ATRA+10ng/ml de TNF. Como muestra la Figura 21, el TNF revirtió el efecto inhibitorio de ATRA sobre la migración de los FLS reumatoides.

7. Identificación de genes regulados diferencialmente mediante microarrays de expresión génica

Con el fin de analizar los mecanismos moleculares responsables del efecto de ATRA en sinoviocitos reumatoides sometidos o no, a la estimulación con TNF, realizamos un microarray de genoma completo, que incluye sondas para más de 26.000 genes únicos. Para ello, FLS de seis pacientes con AR, fueron tratados durante 12h con 5μM de ATRA, 10ng/ml de TNF, TNF+ATRA o el diluyente de ATRA (0,04625% de DMSO, como condición basal). Posteriormente, se extrajo el ARN de estos seis pacientes tratados y las muestras se mezclaron y agruparon en dos, quedando dos muestras de tres pacientes cada una para cada tratamiento, que se utilizaron para la realización del microarray.

Los datos de expresión génica obtenidos en el microarray se analizaron con el fin de identificar vías funcionales diferencialmente enriquecidas en las comparaciones con los distintos tratamientos. En primer lugar, se realizó un análisis no paramétrico *Rank Product* y, posteriormente, un análisis GSEA *Preranked*, como se detalla en el apartado de materiales y métodos. Se establecieron los siguientes criterios para seleccionar las vías enriquecidas: valores de NES>3, p NOM<0,01, q FDR<0,01 y FWER<0,05. En las Tablas 6 y 7 se muestran las vías enriquecidas según dichos criterios. Como se observa en la tabla 6, la vía de “Transición epitelio-mesénquima” está enriquecida en la

comparación ATRA<Control con un alto valor de significación estadística, valor de q FDR y de FWER del orden de 10^{-4} . Además, con un valor q y FWER del mismo orden, esta vía también está enriquecida en la comparación TNF+ATRA>ATRA. Algunos de los genes de esta vía “Transición epitelio-mesénquima” se han implicado en los procesos de migración e invasión celular, por lo que podrían estar implicados en el efecto observado en los sinoviocitos reumatoides tras el tratamiento con ATRA.

No obstante, las vías enriquecidas principales, no están mayoritariamente implicadas en migración, si no que en las comparaciones ATRA>Control, TNF>Control, así como TNF+ATRA>Control, las principales vías enriquecidas están implicadas en la respuesta inflamatoria, respuesta autoinmune o control del ciclo celular, entre otras. Un ejemplo de vías implicadas en la respuesta inmune, son las vías de respuesta al IFN α y γ que aparecen enriquecidas con un valor de q y de FWER del orden de 10^{-4} , en las comparativas ATRA>Control, TNF>Control o TNF+ATRA>Control. Además, estas vías aparecen enriquecidas en la comparación TNF+ATRA<TNF, lo que parece indicar que el tratamiento combinado TNF+ATRA posee un efecto antagónico, con respecto a TNF, en la modulación de genes implicados en ambas vías. Por otro lado, como ejemplo de vía implicada en el control del ciclo celular, está la vía de dianas del factor de transcripción E2F, que aparece con valor q y FWER del orden de 10^{-4} , en las comparativas ATRA>Control, TNF>Control y TNF+ATRA>Control. Con el mismo valor de q y FWER, en las mismas comparaciones encontramos la vía de señalización de TNF a través de NF- κ B, involucrada en la respuesta inflamatoria. Además estas dos vías aparecen también enriquecidas en las comparativas TNF+ATRA>ATRA. Asimismo, la vía de dianas de E2F está significativamente enriquecida en la comparación TNF+ATRA>TNF. Estos resultados apuntan hacia un efecto sinérgico del tratamiento combinado de TNF+ATRA sobre la expresión de los genes que componen estas vías.

Tabla 6. Vías enriquecidas en los distintos tratamientos con relación al control.

VÍAS DE GENES MSIGDB HALLMARK ENRIQUECIDAS					
COMPARACIÓN	VÍAS HALLMARK	NES	p-val	q-val	FWER
ATRA<CONTROL	TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA	4,341	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
ATRA>CONTROL	DIANAS E2F	4,511	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	RESPUESTA AL IFN α	4,415	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	RESPUESTA AL IFN γ	4,113	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	PUNTO DE CONTROL G2M	3,630	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	SEÑALIZACIÓN DE TNF VÍA NF- κ B	3,209	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	DIANAS MYC V1	3,209	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
TNF<CONTROL	MIOGÉNESIS	3,656	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
TNF>CONTROL	RESPUESTA AL IFN γ	10,391	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	RESPUESTA AL IFN α	8,616	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	SEÑALIZACIÓN DE TNF VÍA NF- κ B	7,574	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	RESPUESTA INFLAMATORIA	7,265	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	DIANAS E2F	6,299	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	PUNTO DE CONTROL G2M	6,07	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	SEÑALIZACIÓN IL-6 JAK STAT3	4,892	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	RECHAZO DE ALOINJERTO	4,676	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	SEÑALIZACIÓN MTORC1	4,638	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	COMPLEMENTO	3,86	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	DIANAS MYC V2	3,641	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	CHOLESTEROL HOMEOSTASIS	3,447	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	DIANAS MYC V1	3,204	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	SEÑALIZACIÓN IL-2 STAT5	3,071	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	GENES SOBREEXPRESADOS POR KRAS	3,047	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
TNF+ATRA>CONTROL	RESPUESTA AL IFN γ	9,818	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	DIANAS E2F	8,294	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	RESPUESTA AL IFN α	8,031	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	RESPUESTA INFLAMATORIA	6,933	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	PUNTO DE CONTROL G2M	6,881	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	SEÑALIZACIÓN DE TNF VÍA NF- κ B	6,667	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	SEÑALIZACIÓN MTORC1	5,879	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	DIANAS MYC V1	5,864	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	RECHAZO DE ALOINJERTO	5,329	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	SEÑALIZACIÓN IL-6 JAK STAT3	4,289	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	DIANAS MYC V2	3,952	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	COMPLEMENTO	3,832	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	GLICÓLISIS	3,558	2*10 ⁻³	2*10 ⁻³	<10 ⁻⁴
	FOSFORILACIÓN OXIDATIVA	3,544	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL	3,507	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	RESPUESTA PROTEÍNAS DESPLEGADAS	3,449	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	GENES SOBREEXPRESADOS POR UV	3,419	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	GENES SOBREEXPRESADOS POR KRAS	3,253	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴

Tabla 7. Vías enriquecidas en el tratamiento combinado con relación al TNF o a ATRA.

VÍAS DE GENES MSIGDB HALLMARK ENRIQUECIDAS					
COMPARACIÓN	VÍAS HALLMARK	NES	p-val	q-val	FWER
TNF+ATRA<TNF	RESPUESTA AL IFN α	4,084	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	RESPUESTA AL IFN γ	3,466	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
TNF+ATRA>TNF	DIANAS E2F	7,461	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	DIANAS MYC V1	5,805	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	PUNTO DE CONTROL G2M	5,640	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	SEÑALIZACIÓN MTORC1	4,756	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	FOSFORILACIÓN OXIDATIVA	3,668	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	HUSILLO MITÓTICO	3,428	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	REPARACIÓN DEL ADN	3,413	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
TNF+ATRA>ATRA	RESPUESTA AL IFN γ	8,638	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	DIANAS E2F	8,599	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	RESPUESTA AL IFN α	7,598	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	RESPUESTA INFLAMATORIA	7,21	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	SEÑALIZACIÓN DE TNF VÍA NF- κ B	6,969	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	PUNTO DE CONTROL G2M	6,545	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	SEÑALIZACIÓN MTORC1	5,883	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	DIANAS MYC V1	5,397	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	RECHAZO DE ALOINJERTO	5,019	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	SEÑALIZACIÓN IL-6 JAK STAT3	4,739	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL	4,442	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	COMPLEMENTO	4,138	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	GLICÓLISIS	3,593	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	GENES SOBREEXPRESADOS POR UV	3,383	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	HUSILLO MITÓTICO	3,341	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	DIANAS MYC V2	3,319	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	RESPUESTA PROTEÍNAS DESPLEGADAS	3,255	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	SEÑALIZACIÓN IL-2 STAT5	3,215	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	FOSFORILACIÓN OXIDATIVA	3,123	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴
	TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA	3,000	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴

En base al interés en migración, invasión e inflamación se seleccionaron 10 genes de las vías enriquecidas en las distintas comparaciones. Estos genes se encontraban en el primer decil de la lista de genes que componen las vías. En la tabla 8, se indican los genes seleccionados y las vías enriquecidas en las que aparecen.

Tabla 8. Genes seleccionados dentro de las vías enriquecidas en las distintas comparativas.

GENES	VÍAS
<i>EPSTI1</i>	RESPUESTA AL INF γ Y α
<i>PTX3</i>	TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA
<i>ST3GAL5</i>	RESPUESTA AL INF γ
<i>VCAM1</i>	TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA
<i>MMP1</i>	TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA
<i>CX3CL1</i>	RESPUESTA INFLAMATORIA
<i>NOD2</i>	RESPUESTA INFLAMATORIA
<i>CXCL9/MIG</i>	RESPUESTA INFLAMATORIA Y AL INF γ
<i>CXCL3/GRO3</i>	SEÑALIZACIÓN DE TNF VÍA NF- κ B
<i>IL-1B</i>	RESPUESTA INFLAMATORIA Y SEÑALIZACIÓN DE TNF VÍA NF- κ B

8. Experimentos de validación mediante PCR en tiempo real

Con el fin de validar los resultados obtenidos del microarray, se cuantificó la expresión de ARNm de los genes candidatos, mediante PCR en tiempo real. Para ello, se extrajo el ARN de fibroblastos reumatoides tratados durante 12h con 5 μ M de ATRA, 10ng/ml de TNF, TNF+ATRA o el diluyente de ATRA (0,04625% de DMSO, como control) y se realizaron ensayos de PCR en tiempo real, como se explica en el apartado de materiales y métodos. Como se muestra en la Figura 22, el tratamiento con ATRA redujo significativamente la expresión de los genes *EPSTI1*, *PTX3*, *VCAM1* y *MMP1*, todos implicados en invasión y migración. En efecto, en los sinoviocitos reumatoides tratados con el retinoide, la expresión de *EPSTI1* se redujo el 32,3% y la de *MMP1* el 49%, en comparación con los controles. Sin embargo, la reducción más dramática se produjo en la expresión de *PTX3*, que fue del 86,5% y en la de *VCAM1* que se redujo el 81,7% (Figura 22). No obstante, el tratamiento con TNF indujo la expresión de estos genes en comparación con la situación control. Asimismo, el tratamiento combinado con el retinoide redujo significativamente la expresión inducida por

TNF, aunque no alcanzó los niveles de expresión del tratamiento con ATRA. Por otro lado, como muestra la Figura 22, el tratamiento con ATRA no modificó la expresión de *ST3GAL5*, un gen relacionado con la inhibición de la capacidad invasiva y la migración, mientras que el TNF redujo su expresión en un 79,7%. Además, en el tratamiento combinado TNF+ATRA, la disminución de la expresión de *ST3GAL5* fue significativamente mayor a la observada tras el tratamiento con TNF.

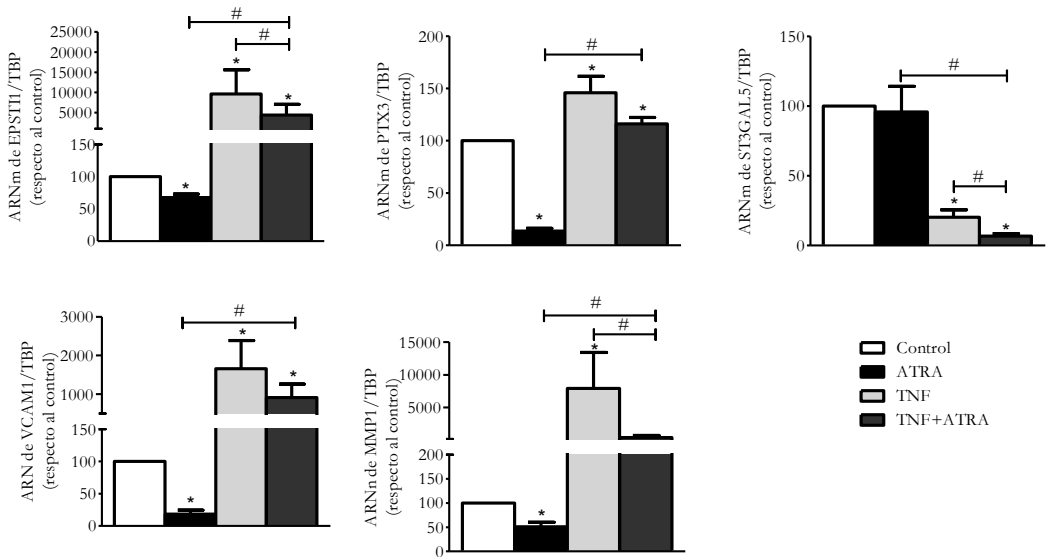


Figura 22. Modulación de la expresión de genes implicados en migración e invasión por ATRA en sinoviocitos reumatoides. Porcentaje de ARNm de los genes *EPSTII*, *PTX3*, *ST3GAL5*, *VCAM1* y *MMP1* en sinoviocitos reumatoides tratados con 5μM de ATRA, 10ng/ml de TNF y TNF+ATRA con respecto al control que se consideró 100%. Los valores son la media±ESM de 5 o 7 pacientes con AR. # indica p<0,05 y * indica p<0,05 frente al control (Wilcoxon de datos pareados).

En la Figura 23 se muestran los niveles de transcripción de los genes implicados en la respuesta inflamatoria. ATRA redujo en más del 50% la expresión de *CX3CL1* cuando se comparó con el control. Los niveles de expresión de *CXCL9* y *CXCL3* también se redujeron tras el tratamiento con el

retinoide, aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística. Además, el tratamiento con ATRA redujo significativamente la expresión inducida por TNF de estos tres genes, así como la del gen *NOD2* (Figura 23). Sorprendentemente, todos los tratamientos indujeron la expresión de *IL-1B* en sinoviocitos reumatoides. Así el tratamiento con ATRA en comparación con el control aumentó alrededor de 30 veces su expresión, esta fue aumentada más de 500 veces con TNF y la expresión de *IL-1B* tras el tratamiento combinado TNF+ATRA fue más de 1000 veces superior a la del control (Figura 23).

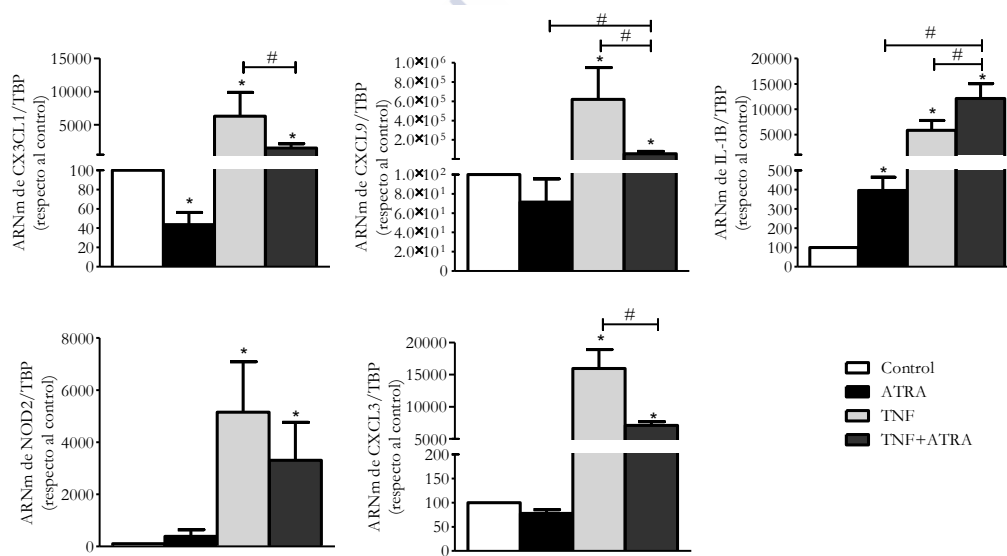


Figura 23. El retinoide ATRA regula la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria de sinoviocitos reumatoides. Porcentaje de ARNm de los genes *CX3CL1*, *CXCL9*, *IL-1B*, *NOD2* y *CXCL3* en sinoviocitos reumatoides tratados con 5 μ M de ATRA, 10ng/ml de TNF y TNF+ATRA con respecto al control que se consideró 100%. Los valores son la media \pm ESM de 5 o 7 pacientes con AR. # indica $p < 0,05$ y * indica $p < 0,05$ frente al control (Wilcoxon de datos pareados).

9. Efecto de ATRA en la respuesta inflamatoria de los sinoviocitos reumatoides.

Teniendo en cuenta que el tratamiento con el retinoide ATRA moduló la expresión de distintos mediadores inflamatorios, se decidió investigar con mayor profundidad la implicación del retinoide en la respuesta inflamatoria. Para ello, se realizó un ensayo de determinación de citoquinas en el sobrenadante de cultivo de sinoviocitos reumatoides utilizando la tecnología Luminex. Se recogió el sobrenadante de FLS de 6 a 8 pacientes con AR, tratados con ATRA 5 μ M, 10ng/ml de TNF o con el tratamiento combinado 5 μ M de ATRA+ 10ng/ml de TNF durante 24h. En este ensayo se analizaron un total de siete citoquinas y quemoquinas, implicadas en la AR, entre las cuales se incluyeron IL-6, CXCL10/IP-10, CXCL11/i-TAC y CCL2/MCP-1 que fueron diferencialmente expresadas en el análisis del microarray. Los resultados que se recogen en las gráficas de la figura 24, muestran que el tratamiento con ATRA no indujo la producción de la mayoría de los mediadores analizados (IL-6, CXCL5/ENA-78, CXCL10, CXCL11, CCL2 o GM-CSF/CSF2), puesto que sus niveles fueron similares a los observados en los controles, sin tratamiento. Sin embargo, ATRA estimuló la secreción de IL-8/CXCL8 y CCL2 en el sobrenadante de los FLS, alcanzando concentraciones 50 veces superiores a las detectadas en los controles. Como se esperaba, el tratamiento con TNF indujo la producción de todos los mediadores analizados. Cuando se valoró el efecto del tratamiento combinado TNF+ATRA se observó un aumento significativo de la secreción de IL-8, así como una disminución de CXCL10 y CXCL11 en la comparación tras el tratamiento con TNF (Figura 24).

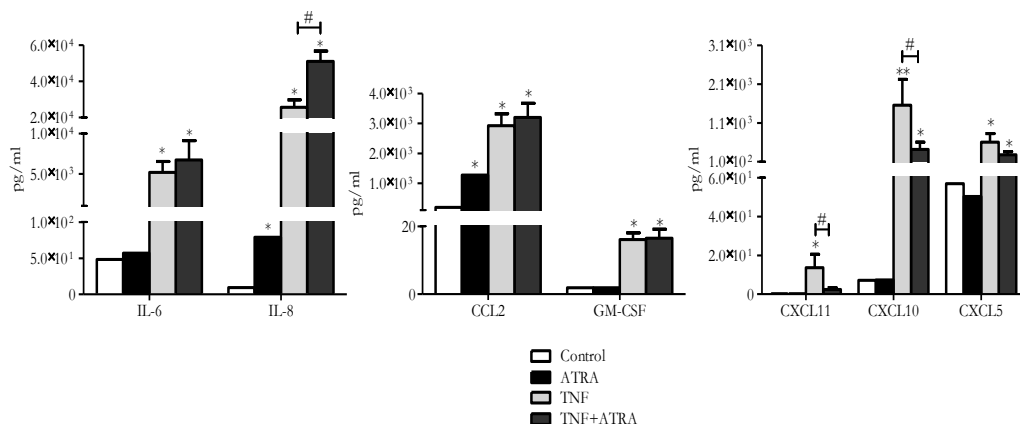


Figura 24. Efecto del tratamiento con ATRA sobre la respuesta inflamatoria de los sinoviocitos reumatoides. Niveles de mediadores inflamatorios en el sobrenadante de cultivo de sinoviocitos reumatoides tratados durante 24h con $5\mu\text{M}$ de ATRA, 10ng/ml de TNF o TNF+ATRA. Los valores son la media \pm ESM de 6-8 líneas de FLS reumatoides diferentes. # indica $p < 0,05$ y ** indica $p < 0,01$ frente al control (Wilcoxon de datos pareados).

10. La reducción de la expresión de VCAM1, PTX3, CX3CL1 contribuye a la regulación de la migración de los sinoviocitos reumatoides inducida por ATRA

Con el fin de analizar en mayor profundidad los mecanismos implicados en el efecto de ATRA sobre la regulación de la migración e invasión de los sinoviocitos reumatoides, se realizaron nuevos experimentos para confirmar la contribución de VCAM1, PTX3 y CX3CL1 al efecto del retinoide. En los experimentos de validación mediante PCR en tiempo real se observó que la expresión de *VCAM1*, *PTX3* y *CX3CL1* disminuyó en más del 50% en los sinoviocitos reumatoides tratados con ATRA. Estas tres proteínas están implicadas en procesos de migración e invasión, además la quimioquina CX3CL1, también conocida como fractalquina, se ha implicado recientemente en la migración de los sinoviocitos reumatoides, por lo que se sugiere que podrían

tener un papel importante en la regulación de la migración de los sinoviocitos mediada por ATRA. Con el fin de estudiar esta posibilidad, se analizó el efecto del tratamiento combinado de ATRA con VCAM1, PTX3 o CXCL1 sobre la migración de los sinoviocitos reumatoides. Para ello, se realizaron ensayos de “cierre de herida”, utilizando insertos de silicona de Ibidi®, como se explica en el apartado de materiales y métodos. Los sinoviocitos reumatoides se sembraron en los insertos y una vez alcanzado el nivel de confluencia, estos se retiraron y se trataron las células con 5 μ M de ATRA, o los tratamientos combinados, ATRA+2 μ g/ml de VCAM1, ATRA+10ng/ml de PTX3, ATRA+10ng/ml de CXCL1 y con el vehículo (0,04625% DMSO), como condición control. Se fotografió la herida inicial (0h) y a las 96h, y se cuantificó el espacio ocupado por los sinoviocitos reumatoides. Como se observa en la figura 25A, el tratamiento con ATRA redujo significativamente la migración observada en el control. Sin embargo, aunque el tratamiento combinado de ATRA con VCAM1, CXCL1 o PTX3 aumentó la capacidad de migración, este incremento no alcanzó la significación estadística. Estos resultados sugieren que las tres proteínas contribuyen a la migración de los sinoviocitos reumatoides, aunque cada una de ellas parece ejercer un efecto pequeño. Por ello, decidimos analizar el efecto conjunto de dos de las proteínas implicadas, PTX3 y CXCL1 sobre la migración de los FLS tras el tratamiento con el retinoide. Como se observa en la figura 25, la combinación de estas proteínas recombinantes incrementó significativamente la migración de los sinoviocitos tratados con ATRA.

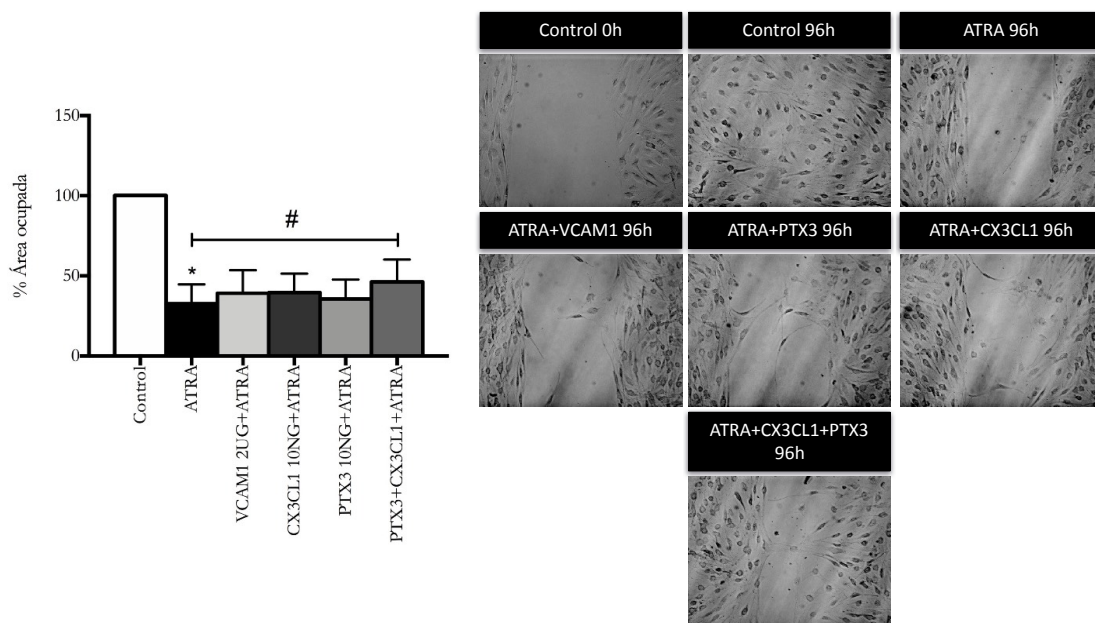


Figura 25. Efecto de las proteínas VCAM1, CX3CL1 y PTX3 sobre la migración de los sinoviocitos reumatoides. A. Porcentaje de área ocupada por sinoviocitos reumatoides tras 96h de tratamiento con 5 μ M de ATRA, tratamiento combinado ATRA con 2 μ g/ml de VCAM1, 10ng/ml de CX3CL1 o 10ng/ml de PTX3 o el tratamiento combinado ATRA+PTX3+CX3CL1, en comparación con la migración del control a 96h que se consideró el 100%. **B.** Imágenes representativas a tiempo 0 y 96h, en las distintas situaciones. Los valores son la media \pm ESM de 6 pacientes con AR. # indica $p < 0,05$ y * indica $p < 0,05$ frente al control (Wilcoxon de datos pareados).

11. La ausencia de *crabp2* no protege de la artritis experimental en el modelo murino por transferencia de suero K/BxN

En los ensayos realizados con sinoviocitos reumatoides se observó que el silenciamiento de *crabp2* aumentaba su sensibilidad a la apoptosis inducida por Fas. Teniendo en cuenta que la resistencia a la apoptosis de los FLS es uno de los factores patogénicos clave en la AR, se decidió analizar el efecto de la ausencia de

crabp2 en un modelo murino de artritis. Para ello se indujo artritis mediante la inyección de suero K/BxN en ratones deficientes en *crabp2* (*crabp2*^{-/-}) y en los controles con genotipo heterocigoto (*crabp2*^{+/-}) y genotipo salvaje (*crabp2*^{+/+}). Todos los ratones se obtuvieron como resultado de mas de 12 retrocruces de los ratones *crabp2*^{+/-} (con fondo mixto de C57BL/6J × 129Sv) con ratones C57BL/6J, como se indica en el apartado material y métodos. Para la inducción de artritis, se inyectaron por vía intraperitoneal 100µl de suero K/BxN al día 0 y 2, en 12 ratones *crabp2*^{-/-}, en 6 ratones *crabp2*^{+/-} y en 6 ratones *crabp2*^{+/+}. La evolución clínica de la artritis se determinó por dos observadores independientes. La evolución de la artritis fue similar en los ratones *crabp2*^{+/+} y *crabp2*^{+/-}, por lo que se consideraron como un grupo control único, *crabp2*⁺. La incidencia de la artritis fue del 100% en los dos grupos de ratones, *crabp2*⁺ y en *crabp2*^{-/-}. Además, al contrario de lo esperado, el curso clínico y la severidad de la enfermedad fue similar en ratones controles y *crabp2* deficientes, y la máxima gravedad se alcanzó a los 7 días (figura 26A). De manera similar, el análisis histológico de las articulaciones tibio-talares y del metatarso y dedos no reveló diferencias en la inflamación sinovial (IS), daño en el cartílago (DC) y erosión ósea (EO) entre los dos grupos de ratones, como se muestra en la Figura 26B e imágenes representativas del estudio histológico en el panel de la figura 26C.

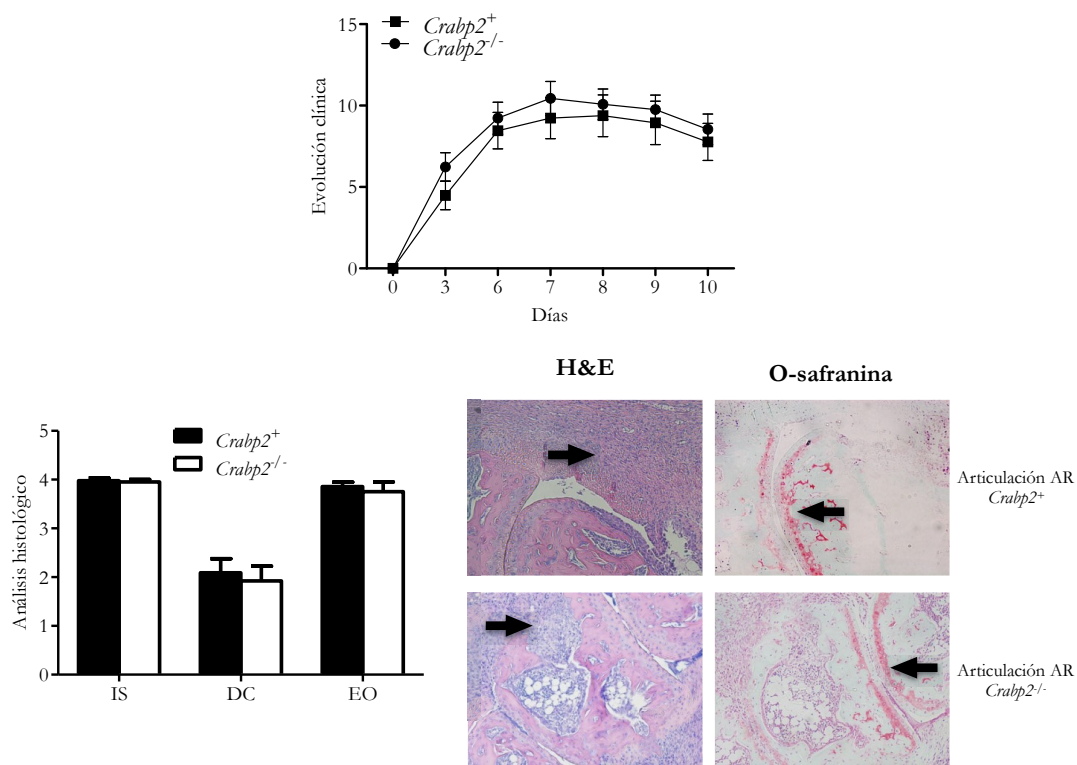


Figura 26. La deficiencia de *crabp2* no modifica la gravedad de la artritis experimental.

A. Evolución clínica tras la inducción de artritis en 12 ratones *crabp2*⁺ y 12 *crabp2*^{-/-}. **B.** Graduación histológicas de la inflamación sinovial (IS), daño del cartilago (DC) y erosión ósea (EO) de las secciones de tobillo y pie de *crabp2*⁺ y *crabp2*^{-/-}. **C.** Imágenes representativas de secciones de tobillo y pie de *crabp2*⁺ y *crabp2*^{-/-} teñidas con H&E y con O-safranina. En la tinción H&E las flechas indican la infiltración celular y en la tinción con O-safranina la pérdida de proteoglicanos en el cartilago erosionado. No existen diferencias significativas (Test Mann-Whitney).

12. El tratamiento con ATRA aumenta la severidad de la artritis

Los resultados previos obtenidos en este trabajo con sinoviocitos reumatoides mostraron que ATRA redujo la capacidad de migración e invasión de estas células. Entonces, se decidió investigar el efecto del tratamiento con el retinoide en un modelo murino de artritis. Para ello, se indujo artritis mediante transferencia de suero de ratones K/BxN en ratones C57BL/6J, que fueron tratados simultáneamente con ATRA. Se utilizaron dos grupos de 12 ratones; en el grupo control, los ratones se trataron con vehículo y en el grupo experimental los ratones se trataron con ATRA. El esquema terapéutico consistió en inyecciones intraperitoneales diarias de 6 mg/kg de ATRA desde el día 0, hasta el sacrificio a día 10. La evolución clínica de la artritis se determinó como se describe en el apartado de materiales y métodos. Como se observa en la Figura 27, la incidencia de la artritis fue del 100% en ratones del grupo control y del grupo tratado con ATRA (Figura 27A). Sorprendentemente, la enfermedad fue significativamente más grave en el grupo tratado con el retinoide que en el control, alcanzando la gravedad máxima a los 7 días. En el panel B de la Figura 27, se muestran imágenes representativas de la pata trasera sana de un ratón, antes de la inducción de la artritis, y a día 10 tras la inducción de artritis, donde se puede observar mayor inflamación en la pata trasera de un ratón tratado con ATRA que en el ratón control. Asimismo, el análisis histológico de las articulaciones tibio-talares y de las articulaciones del metatarso y dedos reveló diferencias en la inflamación sinovial, daño en el cartílago y erosión ósea, siendo mayor en el grupo tratado con ATRA frente al control (Figura 27C). Las imágenes representativas de la histología se observan en el panel de la Figura 27D.

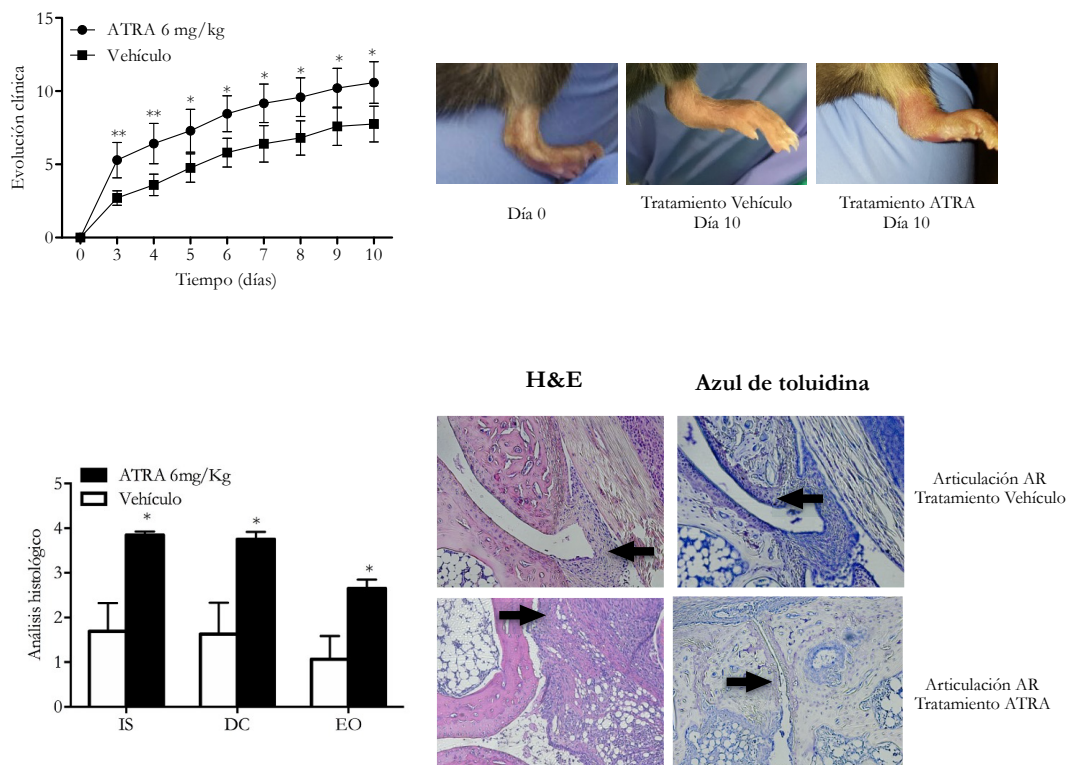


Figura 27. El tratamiento con ATRA incrementó la severidad de la artritis experimental. **A.** Evolución clínica tras la inducción de artritis en 13 ratones C57BL/6J, tratados con ATRA o vehículo durante 10 días. **B.** Imágenes representativas de la evolución clínica de la artritis en los ratones tratados con vehículo o ATRA. **C.** Graduación histológica de la inflamación sinovial (IS), daño del cartilago (DC) y erosión ósea (EO) de las secciones de tobillo y pie de C57BL/6J tratados con ATRA y controles. **D.** Imágenes representativas de las secciones de tobillo y pie de C57BL/6J teñidas con H&E y con azul de toluidina. En la tinción H&E las flechas indican la infiltración celular y en la tinción con azul de toluidina la pérdida de metacromasia en el cartilago erosionado. * indica $p < 0,05$ frente al vehículo (Test Mann-Whitney).



DISCUSIÓN



Numerosos trabajos en cultivos celulares han demostrado que el retinoide ATRA disminuye la proliferación, incrementa la apoptosis y promueve la diferenciación celular^{124,138,139,145,156-158,160-165,176-185,187,201,203,231-233}. Estos efectos han sido determinantes para que en los últimos años los retinoides se hayan utilizado con éxito en el tratamiento de varios tipos de enfermedades dermatológicas, como el acné, la psoriasis, trastornos de queratinización, las lesiones precancerosas de piel, y el cáncer de piel de tipo no melanoma²³⁴. Del mismo modo, han mostrado efectos beneficiosos en el tratamiento de distintos tipos de cáncer, principalmente en leucemia promielocítica aguda (APL), en sarcoma de Kaposi y en linfoma cutáneo de células T²³⁴. Debido a las características “pseudotumorales” de los sinoviocitos reumatoides nos planteamos que el tratamiento con ATRA podría ser beneficioso, controlando la proliferación exacerbada y la resistencia a la apoptosis, características de estas células. No obstante, nuestros resultados mostraron que ATRA no tiene efecto sobre la proliferación espontánea de los FLS reumatoides, y que al contrario de lo esperado, no disminuye la resistencia a la apoptosis, sino que la incrementa.

La ausencia de efecto sobre la proliferación de los sinoviocitos reumatoides, podría deberse a una resistencia celular al ácido retinoico, la cual ya ha sido demostrada en otros tipos celulares tumorales²³⁵. De hecho, el estudio de Centritto y col, muestra que el 62% de 42 líneas de cáncer mamario analizadas son resistentes al tratamiento con ATRA²³⁶. Las causas de esta resistencia son variadas y se encuentran en distintos puntos de la vía de señalización del retinoide. Una causa prominente en la resistencia de los tumores de mama al ATRA, es la pérdida del receptor $RAR\alpha$, uno de los tres receptores nucleares del ácido retinoico ($RAR\alpha/\beta/\gamma$), de hecho se ha descrito que las líneas celulares de carcinoma mamario sensibles al tratamiento con ATRA son aquellas que presentan el receptor $RAR\alpha$ ²³⁶. Además, también en líneas tumorales de cáncer

de mama, se ha probado que agonistas de $RAR\alpha$ inhiben el crecimiento celular, mientras que el silenciamiento de $RAR\alpha$ reduce el efecto antiproliferativo de ATRA²³⁵. Por otro lado, $RAR\beta$ también parece determinante de la sensibilidad a ATRA^{235,237}. Este receptor es detectable en tejido mamario normal, mientras que en carcinogénesis temprana su expresión se pierde o es silenciada epigenéticamente, ausencia que se ha asociado con la resistencia al ácido retinoico²³⁸. Además, se ha demostrado que la expresión de $RAR\beta$ inducida por ATRA está correlacionada con la inhibición del crecimiento de células de cáncer de mama²³⁹. No obstante, la presencia de varias isoformas de $RAR\beta$ complica el escenario, puesto que el silenciamiento de $RAR\beta2$ y $RAR\beta5$ en cultivo celular primario sensibiliza al ATRA, lo que sugiere que su presencia ejercería el efecto opuesto²⁴⁰. En la misma línea actuaría la isoforma $RAR\beta4$, que se encuentra incrementada en varios tipos de cáncer, y se ha descrito que el ratón transgénico para este receptor desarrolla hiperplasia y neoplasia en varios tejidos²⁴¹. Otro mecanismo de resistencia a los retinoides parece ligado a los transportadores del ácido retinoico. Generalmente, el transporte de ATRA mediante iLBPs determina la activación de unos receptores u otros, promoviendo la transcripción de distintos conjuntos de genes. No obstante, dos trabajos de Liu y col^{149,242} han demostrado que en carcinoma mamario y en glioblastoma, las proteínas CRABP1 y CRABP2, respectivamente, no transportan el ácido retinoico al núcleo, si no que lo sequestran en el citoplasma impidiendo su actuación. Mediante este mecanismo, se podría explicar la sensibilización al tratamiento con retinoides de los tumores mamaros receptor de estrógenos positivo (ER+) frente a los tumores ER-, ya que la expresión de CRABP1 es menor en los tumores ER+²⁴². Otro mecanismo de resistencia demostrado es la inactivación metabólica de ATRA debido a la sobreexpresión de la hidrolasa citocromo P450 isoforma 26 (CYP26A1). Además de todos los mecanismos comentados, en células de cáncer de mama se ha descrito que la proteína tipo 3 de unión a factor de crecimiento

tipo insulínico (IGFBP-3) se activa en respuesta al tratamiento de ATRA y bloquea la formación de heterodímeros RAR:RXR, siendo también determinante en la resistencia celular a los retinoides²³⁵.

Por otro lado, algunos carcinomas no sólo muestran ausencia de respuesta al tratamiento con retinoides, si no que la terapia induce el efecto contrario. Por ejemplo, en el estudio de Verma y col²⁴³, el tratamiento con ácido retinoico aumenta la formación de tumores de piel en un modelo animal de ratón y del mismo modo, en el trabajo de Schug y col¹³⁴ el ácido retinoico facilita el crecimiento tumoral en un modelo murino de cáncer de mama. Asimismo, los resultados del ensayo clínico CARET (The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial), que tenía como objetivo medir la eficacia quimiopreventiva y la seguridad del β -caroteno y del retinol en cáncer de pulmón y enfermedad cardiovascular, demostraron que la vitamina A tenía un efecto perjudicial. Durante cuatro años se trataron fumadores, ex fumadores y trabajadores con amianto con β -caroteno y vitamina A y se observó que el tratamiento aumentaba la incidencia de cáncer de pulmón, y el riesgo de muerte por cáncer de pulmón o enfermedad cardiovascular²⁴⁴. Así pues, parece indicar que en algunas circunstancias, el ácido retinoico actúa como un agente procarcinogénico, lo que concuerda con el aumento de la resistencia a la apoptosis observado en sinoviocitos reumatoides tras el tratamiento con ATRA. No es la primera vez que el tratamiento con retinoides reduce la apoptosis inducida por Fas. De hecho, tres trabajos realizados en hibridomas de células T, han demostrado que tanto el metabolito 9cRA como el metabolito ATRA, inhiben la expresión de FasL, disminuyendo la apoptosis mediada por Fas^{191,245,246}.

El efecto antiapoptótico de ATRA, se ha demostrado en distintos tipos celulares^{134,188-192}, aunque los mecanismos responsables son complejos y en muchos casos desconocidos. No obstante, los trabajos del grupo de Noa Noy

han mostrado la importancia en este efecto de la liberación diferencial de los retinoides a sus receptores nucleares, mediante las proteínas transportadoras CRABP2 y FABP5^{124,134,137,155}. CRABP2 transporta el ácido retinoico al receptor RAR^{145,159}, y FABP5 lo transporta al receptor PPAR β/δ ^{135,136}. Los receptores RAR o PPAR β/δ promueven la expresión de distintos conjuntos de genes, con funciones opuestas, por lo que el ratio de expresión celular de los transportadores CRABP2/FABP5 determina el efecto del tratamiento con ATRA. Así, en células con una elevada expresión de FABP5, se expresan genes promovidos por PPAR β/δ , relacionados con el incremento de la supervivencia y proliferación celular, tal y como se ha observado en cáncer de mama^{134,155} y próstata²⁴⁷. Por otro lado, en células con mayor expresión de CRABP2, el tratamiento con el retinoide lleva a una parada del ciclo celular y un incremento de la apoptosis^{145,150,159}. Sin embargo, en este trabajo de tesis, hemos demostrado que, a pesar de que los sinoviocitos reumatoides poseen una alta relación CRABP2/FABP5, el tratamiento con el retinoide no regula la proliferación espontánea, e incluso incrementa la resistencia a la apoptosis inducida por Fas. Nuestros resultados no son convencionales, pero existen precedentes de este efecto. Así, la ausencia de correlación del efecto de ATRA con el ratio de sus transportadores se ha constatado en distintas líneas celulares de glioblastoma^{149,248}. De hecho, como ya hemos comentado, en el glioblastoma, la proteína CRABP2 secuestra al ácido retinoico en el citoplasma e impide que lleve a cabo sus funciones proapoptóticas¹⁴⁹. Así pues, los resultados señalan que el mecanismo de CRABP2 y FABP5 es mucho más complejo que el transporte hacia uno u otro receptor. De hecho, el silenciamiento de los transportadores CRABP2 y FABP5 en sinoviocitos reumatoides, nos descubrió los hallazgos más sorprendentes de nuestro trabajo. Primero, el tratamiento con ATRA en sinoviocitos reumatoides silenciados para FABP5, no aumentó la apoptosis espontánea, ni la inducida por Fas. Estos resultados reforzaron la independencia

de la relación CRABP2/FABP5 con el tratamiento de ATRA en los fibroblastos reumatoides. Aún así, se podría considerar que en los FLS de pacientes con AR, la entrega diferencial hacia RAR/PPAR β/δ fuera contraria a la descrita. Sin embargo, el silenciamiento de CRABP2 no demostró cambios en el efecto antiapoptótico de ATRA. Así pues, el retinoide no sensibiliza los sinoviocitos reumatoides a la apoptosis inducida por Fas, independientemente de la carencia de un transportador u otro. Por lo tanto, estos resultados indican que el ácido retinoico tiene un comportamiento idiosincrático en sinoviocitos reumatoides.

Nuestro resultado más sorprendente fue la sensibilización a la apoptosis inducida por Fas en los sinoviocitos reumatoides carentes de CRABP2. El transportador CRABP2 posee un efecto independiente del ácido retinoico que parece contribuir a la resistencia a la apoptosis de los FLS de pacientes con AR. Los efectos de CRABP2 independientes de ligando ya han sido descritos por Donato y col¹⁴⁵, que demostraron que el aumento de expresión de CRABP2, incrementaba la expresión de Apaf1, y la hidrólisis de las caspasas 7 y 9, contribuyendo a la inducción de apoptosis en células de cáncer de mama. Más investigaciones del equipo de Noa Noy, describieron con detalle esta función de CRABP2 independiente de su ligando. La proteína transportadora CRABP2 en células tumorales de mama interacciona con la proteína HuR, la cual regula la expresión de determinados genes apoptóticos, mediante la estabilización de transcritos de ARNm^{150,151}. Sin embargo, nuestros resultados muestran que CRABP2 en los sinoviocitos reumatoides tendría un papel antiapoptótico. En esta línea se han publicado dos trabajos recientes^{149,152}. En el trabajo de Liu y col¹⁴⁹, el silenciamiento de la expresión de CRABP2 sensibilizó las células de glioblastoma a la apoptosis inducida por ácido retinoico. Como ya hemos comentado, este efecto se atribuyó en parte al secuestro citoplasmático del ácido retinoico por CRABP2 y por otro lado, a que la expresión de CRABP2 se relacionó con la inducción de una proteína pequeña de choque térmico con

funciones antiapoptóticas (CRYAB). Más próximo a nuestros resultados se encuentra el trabajo de Fischer-Huchzermeyer y col¹⁵², donde el silenciamiento de CRABP2, en ausencia de ácido retinoico, disminuyó la proliferación e indujo apoptosis de células tumorales malignas de la vaina del nervio periférico. Además, se observó una reducción de la viabilidad, sin apoptosis detectable, en una variedad de células que incluían fibroblastos normales y derivados de neurofibroma. Los mecanismos de la viabilidad reducida o del aumento de la apoptosis espontánea no se identificaron, aunque se observó la inducción de la vía de IFN tipo 1. Por lo tanto, el papel idiosincrático de CRABP2 en RA FLS tiene un precedente en otros tipos de células, siendo el más parecido, aquel observado en otros fibroblastos.

Con el fin de dilucidar los mecanismos responsables del aumento de la sensibilidad a la apoptosis inducida por Fas en RA FLS tras silenciamiento de *CRABP2*, se realizó un array de expresión de genes relacionados con la vía apoptótica de Fas. Se observó que el silenciamiento de *CRABP2* en sinoviocitos reumatoides incrementó la expresión de ASK1 y disminuyó la de ERK en comparación con el control. ASK1 es una MAPKK que se activa mediante la unión a la proteína DAXX tras la estimulación con Fas. ASK1 activada, fosforila JNK, activándola a su vez⁶⁷. Con el fin de comprobar el nivel de activación de JNK en sinoviocitos reumatoides deficientes en *CRABP2*, se analizó la expresión de JNK fosforilado, mediante western blot. Los resultados mostraron un incremento de la fosforilación de JNK en células deficientes en *CRABP2* en comparación con los controles. El aumento de expresión de ASK1 y la consecuente activación de JNK mediante fosforilación, contribuye a la sensibilización a la apoptosis de los FLS reumatoides deficientes en *CRABP2*, puesto que la proteína JNK fosforilada, se transloca al núcleo y dirige la expresión de genes proapoptóticos, como FasL o Bak o activa la vía mitocondrial de la apoptosis⁶⁴. Como ya se ha comentado en la introducción, los FLS son

células de tipo II, en las que la apoptosis inducida por el receptor de muerte requiere la activación de la vía mitocondrial⁷⁵. Por otro lado, la disminución de la expresión de ERK también contribuiría al incremento de la apoptosis, puesto que se ha descrito que esta proteína interfiere con la apoptosis inducida por Fas^{61,62}.

Estos resultados señalan a CRABP2 como una diana terapéutica potencial, puesto que el incremento de la apoptosis inducida por Fas, podría llevar a la reducción de la hiperplasia sinovial. En este sentido, en distintos modelos murinos se ha demostrado que la inducción de la vía de apoptosis Fas es beneficiosa en el control de la artritis⁹⁴. No obstante, la AR es una enfermedad compleja, en la que múltiples estímulos proinflamatorios podrían revertir el efecto observado en el silenciamiento de *CRABP2* sobre la vía Fas. Entre ellos caben destacar TNF e IL-1 β , dos citoquinas fundamentales en la AR, implicadas en la supervivencia de los FLS reumatoides⁴⁴. De hecho, TNF es un inductor de la apoptosis en la mayoría de las células, pero en sinoviocitos reumatoides, actúa incrementando la proliferación^{86,87} e induciendo resistencia a la apoptosis inducida por Fas¹⁰¹. Nuestros resultados mostraron que el incremento de la apoptosis en el silenciamiento de *CRABP2* persiste en presencia de ambas citoquinas proinflamatorias.

Con el fin de investigar en mayor profundidad el papel de CRABP2 en la patogenia de la AR, se indujo artritis en ratones deficientes en *crabp2*. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la incidencia o evolución clínica de la artritis, ni en el análisis histológico cuando se compararon ratones deficientes en *crabp2* con el genotipo salvaje. Estos resultados indican que el aumento de la sensibilidad a la apoptosis de los sinoviocitos no es suficiente para vencer otros factores que intervienen en la patogenia de la enfermedad. Es posible que el efecto aditivo de varios mediadores inflamatorios en la sinovia neutralice el efecto de la ausencia de *crabp2* sobre la apoptosis. En este sentido, en los ensayos

in vitro observamos que, aún en presencia de TNF o IL-1 β , los sinoviocitos CRABP2 deficientes fueron mas sensibles a la apoptosis inducida por Fas que los controles; sin embargo, el nivel de apoptosis fue menor que el observado en ausencia de TNF o IL-1 β . Otra causa posible de la falta de efecto protector en el modelo murino, puede estar relacionada con el efecto dual de ASK1 sobre los sinoviocitos reumatoides, puesto que además de promover la apoptosis celular, se ha descrito que incrementa la producción de citoquinas proinflamatorias⁶³. En este sentido, el estudio de Terauchi y col⁶⁹ demostró que mientras la expresión inducida de ASK1 en sinoviocitos reumatoides incrementó la apoptosis, el aumento de la expresión de ASK1 mediante la inyección de adenovirus en el modelo CIA incrementó la severidad de la artritis. Además, en un estudio reciente²⁴⁹, se ha descrito la reducción de la severidad de la artritis en ratones CIA tratados con un inhibidor farmacológico de ASK1. Por lo tanto, aunque en sinoviocitos reumatoides CRABP2 incrementa la apoptosis inducida por Fas, los resultados *in vivo* no muestran un efecto terapéutico sobre el control de la severidad de la artritis.

Durante la patogenia de la AR, los sinoviocitos reumatoides incrementan su capacidad de migración y adquieren un comportamiento agresivo e invasivo que lleva a la destrucción del cartílago⁴⁹. Por lo tanto, el control de esta característica patogénica de los FLS reumatoides podría ser clave para mejorar la evolución clínica de los pacientes con AR. En este trabajo hemos demostrado que ATRA reduce en gran medida la capacidad de invasión y migración de los FLS reumatoides. En nuestro conocimiento, estos resultados son los primeros en mostrar el control de los retinoides sobre la migración en sinoviocitos reumatoides, aunque estos efectos ya se habían descrito con anterioridad en otros fibroblastos. El trabajo de Guan y col²⁰⁴ demostró que ATRA inhibía la motilidad de fibroblastos asociados a cáncer (CAFs), mediante la disminución de la

expresión de la actina de músculo liso alfa (α SMA), la proteína de activación de fibroblastos alfa (FAP) e IL-6. El efecto del retinoide sobre células CAFs, indujo inhibición de la migración y de la transición epitelio mesénquima de células tumorales pancreáticas, aunque el ácido retinoico no tuvo un efecto terapéutico directo sobre estas células tumorales. Otros estudios sí han descrito el efecto antimigratorio de ATRA en células tumorales^{196–203}. En cáncer de mama el tratamiento con ATRA impidió el movimiento celular sobre fibronectina, a través de la disminución de la expresión o actividad de múltiples moléculas implicadas en migración, como MMP9, integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha V\beta 3$, FAK o moesina, entre otras^{197,198}. Además, ATRA no sólo intervino disminuyendo la expresión transcripcional de estos genes, si no que también actuó a nivel posttraduccional, fosforilando proteínas, como FAK o moesina, e induciendo su translocación al núcleo, impidiendo así la formación de adhesiones focales¹⁹⁹. Así pues, ATRA actúa sobre la capacidad de migración a distintos niveles, transcripcional y posttraduccional. De este modo, se ha observado que ATRA también interfiere en la vía NOTCH¹⁹⁶ o en la vía de la angiopoyetina-Tie2²⁰¹, regulando la migración e invasión celular.

Por otro lado, nuestros resultados han mostrado que en presencia de TNF, ATRA no reduce la capacidad de migración de los sinoviocitos reumatoides, sino que tiende a incrementarla. Este resultado es consistente con el efecto sinérgico de TNF y ATRA descrito con anterioridad en la producción de quimioquinas o en el incremento de la apoptosis. Así por ejemplo, en el trabajo de Chatterjee y col²¹⁶, en células de una línea de adenocarcinoma colorrectal, ATRA incrementó la expresión de CXCL7 inducida por TNF. Asimismo, en células de melanoma, el tratamiento conjunto de TNF y ATRA incrementó la expresión de IL-8²¹⁷. Por otro lado, los trabajos de Manna y col¹⁸⁴ y Mathieu y col¹⁸⁵, demostraron un efecto sinérgico en el incremento de la apoptosis en células de cáncer de pulmón y en células de APL, respectivamente. El estudio de Manna y col¹⁸⁴ explica el

incremento de la apoptosis por un aumento de los receptores de TNF tras el tratamiento con ATRA, mientras que Mathieu y col¹⁸⁶ asocian este efecto a una activación de la cascada PARP-1/JNK en células con señalización represora de NF-κB.

Con el fin de conocer los mecanismos moleculares responsables del efecto de ATRA en sinoviocitos reumatoides hemos analizado el perfil de expresión génica de estas células tratadas con el retinoide, con o sin la estimulación del TNF, utilizando la tecnología microarray. Los resultados mostraron que los distintos tratamientos cambiaron la expresión de una variedad de genes que, posteriormente, fueron agrupados en distintas vías funcionales tras el análisis GSEA *Preranked*. Entre estas vías funcionales, cabe destacar que la vía “Transición epitelio mesénquima” fue la única enriquecida en la comparativa ATRA<Control, coherente con los resultados observados en migración. Para los análisis de confirmación se seleccionaron los genes que, encontrándose en el primer decil de las vías más significativamente enriquecidas en las distintas comparaciones, están implicados en migración o invasión celular, así como en inflamación o artritis. Mediante PCR cuantitativa se confirmó que ATRA redujo la expresión basal y la inducida por TNF de los genes *EPSTI1*, *PTX3*, *VCAM1* y *MMP1*. Los cuatro genes se han implicado en procesos de migración e invasión celular. Aunque *EPSTI1* y *PTX3* no se han relacionado hasta el momento con el fenotipo invasivo de los sinoviocitos reumatoides, distintos trabajos confirman su importancia en migración e invasión tumoral. En concreto, el aumento de expresión de *EPSTI1* se ha asociado con cáncer de mama de mal pronóstico²⁵⁰ y con incremento de la invasión tumoral y metástasis^{251,252}. Por otro lado, se ha descrito que la depleción de *PTX3* en células del carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello²⁵³, cáncer cervical²⁵⁴, adenocarcinoma pulmonar²⁵⁵ o glioma²⁵⁶ inhibió la migración e invasión celular. En el mismo sentido, el tratamiento con *PTX3* recombinante en una línea celular de epitelio tubular de riñón indujo un

aumento de la migración²⁵⁷. Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos implicados en el efecto de PTX3, los estudios de depleción de esta proteína mostraron una disminución de expresión de distintas MMPs, como las metaloproteasas 1²⁵⁶, 2^{254,256}, 3²⁵³ y 9^{254,255}. En esta línea, nuestros resultados han demostrado que el tratamiento con ATRA indujo una disminución de la expresión de MMP1. Por lo tanto, esta disminución podría deberse al efecto del retinoide sobre PTX3. Diversos trabajos en AR relacionan la expresión de MMP1 con la migración de FLS reumatoides. Por ejemplo, el trabajo de Wang y col²⁵⁸ describe que la exposición de sinoviocitos reumatoides a micropartículas derivadas de plaquetas incrementa la adhesión y motilidad celular a través del incremento de MMP1. En la misma línea, el trabajo de Huang y col²⁵⁹ determinó que la activación de la vía receptor tipo 2 discoidina (DDR2), proteína CYR61 y MMP1 incrementaba la invasión y migración de sinoviocitos reumatoides.

Por otro lado, aunque hasta el momento no se ha descrito que la reducción de la expresión de VCAM1 mejore el fenotipo agresivo de los sinoviocitos reumatoides, su participación es clave en la adherencia de estas células al cartílago, proceso necesario para la invasión del mismo²⁶⁰. Además, su elevada expresión se ha relacionado con la migración de células de cáncer de ovario, condrosarcoma y cáncer de mama²⁶¹⁻²⁶³. En base a estos estudios, la disminución observada en la expresión de VCAM1 en el tratamiento con retinoide es coherente con el efecto inhibitorio de ATRA sobre la migración. Además, la disminución de expresión de VCAM1 por retinoides ya se había descrito con anterioridad en tejido renal de un modelo experimental de nefritis autoinmune²⁶⁴. Asimismo, el incremento de la migración por TNF, debida a un aumento de la expresión de VCAM1 también había sido descrito con anterioridad en células madre mesenquimales²⁶⁵.

Los experimentos de confirmación mediante PCR cuantitativa y el análisis Bioplex mostraron que, en sinoviocitos reumatoides, ATRA redujo la expresión inducida por TNF de CXCL3, CXCL9, CXCL10 y CXCL11. Todas estas quimioquinas son quimioatrayentes de células inmunes y además, CXCL9 y CXCL10 se han implicado en la migración e invasión de sinoviocitos reumatoides^{266,267}. Por otro lado, ATRA redujo la expresión espontánea e inducida por TNF de CX3CL1 o fractalquina, que es una molécula de adhesión implicada principalmente en la migración de los leucocitos²⁶⁸. Además, en línea con nuestros resultados, se ha descrito que el tratamiento con CX3CL1 en sinoviocitos reumatoides indujo la reordenación del citoesqueleto e incrementó la migración²⁶⁹. Asimismo, la depleción de CX3CL1 en FLS de pacientes con AR disminuyó la angiogénesis analizada en un modelo experimental de artritis²⁷⁰.

Por lo tanto, parece que la reducción combinada de la expresión de todos estos genes es determinante en la disminución de la migración de los sinoviocitos reumatoides observada tras el tratamiento con ATRA. De hecho, en este trabajo de tesis, se ha demostrado que el tratamiento combinado de ATRA con una de las proteínas recombinantes, VCAM1, PTX3 o CX3CL1 incrementó la migración de los sinoviocitos reumatoides, aunque en ningún caso la diferencia fue significativa. Sin embargo, el tratamiento combinado de sólo dos proteínas, PTX3 y CX3CL1 tras estimulación con ATRA, aumentó significativamente la migración de los sinoviocitos reumatoides reducida por el tratamiento con el retinoide.

Aunque el tratamiento con el retinoide redujo la expresión o la secreción de varios mediadores inflamatorios en medio de cultivo de los sinoviocitos reumatoides, ATRA incrementó la expresión de IL-1 β , y la secreción de IL-8 y CCL2. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros trabajos que han descrito un incremento de la expresión de CCL2^{271,272}, IL-1 β ^{273,274} e IL-8²⁷⁵ en

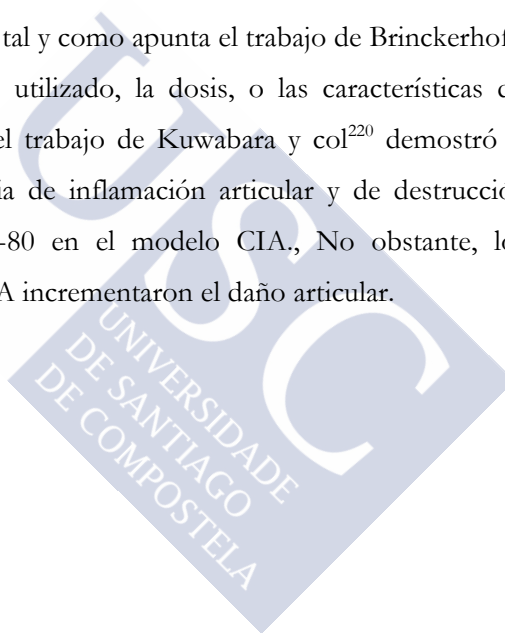
células de leucemia promielocítica aguda tratadas con ATRA. Además, la expresión de CCL2 aumentó en el tratamiento con retinoide de células tumorales de Wilms²⁷⁶, células alveolares epiteliales²⁷¹, eosinófilos²⁷⁷ o en el modelo murino de obstrucción uretral unilateral²⁷⁸. Asimismo, la expresión de IL-8 incrementó en queratinocitos humanos sanos²⁷⁹ y células epiteliales traqueobronquiales²⁸⁰ tratadas con ATRA. Por otro lado, en nuestros resultados el tratamiento con ATRA potenció la expresión inducida por TNF de IL-1 β e IL8, un efecto ya observado en células epiteliales de cáncer de ovario²⁸¹. También en melanoma, el tratamiento combinado de TNF+ATRA incrementó la expresión de IL-8²¹⁷.

El conjunto de estos resultados indica que el papel regulador de ATRA en la respuesta inflamatoria es complejo y dependiente de tejido, de los mediadores inflamatorios y de la patología. En este sentido, distintos trabajos realizados en modelos de patologías inflamatorias crónicas mostraron que el tratamiento con retinoides tuvo un efecto protector^{210–213}. Sin embargo, como se ha comentado en la introducción, los resultados contradictorios obtenidos en distintos trabajos con modelos experimentales de artritis y la falta de estudios en la AR no ha permitido establecer definitivamente si el efecto de los retinoides en esta enfermedad es beneficioso.

Con el fin de validar los resultados del tratamiento con ATRA sobre el fenotipo invasivo de los sinoviocitos reumatoides, se analizó el efecto del retinoide en el modelo de artritis por transferencia de suero, K/BxN. Contrariamente a lo esperado, el tratamiento incrementó la severidad de la artritis, la inflamación sinovial, el daño del cartílago y la erosión ósea. Estos datos indican que la reducción de factores claves en la quimioatracción y en los procesos de migración e invasión mediados por ATRA, en los sinoviocitos residentes no son suficientes para conseguir un control de la enfermedad. Es posible que la persistencia de la respuesta inflamatoria en sinoviocitos sobrepase

los efectos beneficiosos del retinoide y el balance final sea negativo. Por lo tanto, sería necesario analizar el efecto de ATRA combinado con otros tratamientos que controlen la inflamación.

Por otro lado, nuestros resultados concuerdan con el trabajo de Trentham y col²¹⁸, en el que el tratamiento con el análogo del retinoico, 13-cis-RA, incrementó la severidad de la artritis en el modelo CIA. Sin embargo, otros trabajos ^{219–223} mostraron una disminución de la severidad de la artritis en el grupo tratado con retinoide frente al control. Estos resultados contradictorios podrían estar relacionados, tal y como apunta el trabajo de Brinckerhoff²¹⁹ con las diferencias en el retinoide utilizado, la dosis, o las características del modelo animal. Así por ejemplo, el trabajo de Kuwabara y col²²⁰ demostró protección frente a la artritis, ausencia de inflamación articular y de destrucción ósea en ratones tratados con Am-80 en el modelo CIA., No obstante, los mismos experimentos con 13-cis-RA incrementaron el daño articular.





CONCLUSIONES



Las conclusiones de este trabajo de tesis son:

1. La vía de los retinoides muestra una regulación compleja e idiosincrática en sinoviocitos reumatoides.
2. ATRA no presenta los efectos convencionales antiproliferativos y proapoptóticos en FLS reumatoides, a pesar de poseer un ratio de expresión CRABP2/FABP5 elevado.
3. El silenciamiento de CRABP2 sensibiliza a los sinoviocitos reumatoides a la apoptosis inducida por Fas.
4. Esta sensibilización a la apoptosis se debe al incremento de expresión de ASK1, al aumento de fosforilación de JNK y la disminución de la expresión de ERK.
5. El incremento de la apoptosis inducida por Fas en ausencia de *CRABP2*, persiste a pesar de la presencia de las citoquinas inflamatorias, TNF e IL-1 β .
6. La ausencia de *crabp2* no modifica la severidad de la artritis en ratones con artritis inducida por transferencia de suero, K/BxN.
7. ATRA reduce la migración e invasión de sinoviocitos reumatoides mediante la disminución de la expresión de genes implicados en estos procesos, entre los que destacan VCAM1, PTX3, MMP1 y CX3CL1.
8. El tratamiento combinado con las proteínas recombinantes PTX3 y CX3CL1, revierte el efecto inhibitor de ATRA sobre la migración de sinoviocitos reumatoides.
9. ATRA modula la expresión de genes de respuesta inflamatoria.

10. El tratamiento con ATRA en ratones con artritis inducida por transferencia de suero, K/BxN, empeora la evolución clínica de la artritis, la inflamación sinovial, el daño del cartílago y la erosión ósea.





Conflictos de interés:

La autora declara que no tiene conflictos de interés.





BIBLIOGRAFÍA



1. Firestein, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* **423**, 356–61 (2003).
2. Smolen, J. S., Aletaha, D. & McInnes, I. B. Rheumatoid arthritis. *Lancet* **388**, 2023–2038 (2016).
3. Shah, A. & St Clair, W. Manifestaciones Clínicas. 1–18 (2000).
4. Storey, G. D. Alfred Baring Garrod (1819-1907). *Rheumatology (Oxford)*. **40**, 1189–1190 (2001).
5. Arnett, F. C. *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* **31**, 315–324 (1988).
6. Scott, D. L., Wolfe, F. & Huizinga, T. W. J. Rheumatoid arthritis. *Lancet* **376**, 1094–1108 (2010).
7. Aletaha, D. *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and Rheumatism* **62**, 2569–2581 (2010).
8. Gómez, A. Nuevos criterios de clasificación de artritis reumatoide. *Reumatol. Clin.* **6**, 33–37 (2010).
9. Silman, A. J. & Pearson, J. E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* **4 Suppl 3**, S265-72 (2002).
10. Arend, W. P. & Firestein, G. S. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **8**, 573–586 (2012).
11. MacGregor, a J. *et al.* Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* **43**, 30–7 (2000).
12. Gregersen, P. K., Silver, J. & Winchester, R. J. The Shared Epitope Hypothesis. *Arthritis Rheum.* **30**, 1205–1212 (1987).
13. Malmström, V., Catrina, A. I. & Klareskog, L. The immunopathogenesis of from triggering to targeting. *Nat. Publ. Gr.* (2016). doi:10.1038/nri.2016.124
14. Jiang, X. *et al.* To what extent is the familial risk of rheumatoid arthritis

- explained by established rheumatoid arthritis risk factors? *Arthritis Rheumatol.* **67**, 352–362 (2015).
15. Begovich, A. B. *et al.* A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 330–337 (2004).
 16. Vang, T. *et al.* Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat. Genet.* **37**, 1317–1319 (2005).
 17. Viatte S, Plant D, R. S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* **9**, 141–153 (2013).
 18. Bottini, N. & Firestein, G. S. Epigenetics in rheumatoid arthritis: A primer for rheumatologists. *Curr. Rheumatol. Rep.* **15**, (2013).
 19. Richardson, B. *et al.* Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **33**, 1665–1673 (1990).
 20. Liu, C.-C. *et al.* Global DNA methylation, DNMT1, and MBD2 in patients with rheumatoid arthritis. *Immunol. Lett.* **135**, 96–99 (2011).
 21. Neidhart, M. *et al.* Retrotransposable L1 elements expressed in rheumatoid arthritis synovial tissue: association with genomic DNA hypomethylation and influence on gene expression. *Arthritis Rheum.* **43**, 2634–2647 (2000).
 22. Chung, Y. L., Lee, M. Y., Wang, A. J. & Yao, L. F. A therapeutic strategy uses histone deacetylase inhibitors to modulate the expression of genes involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Mol. Ther.* **8**, 707–717 (2003).
 23. Joosten, L. A. B., Leoni, F., Meghji, S. & Mascagni, P. Inhibition of HDAC activity by ITF2357 ameliorates joint inflammation and prevents cartilage and bone destruction in experimental arthritis. *Mol. Med.* **17**, 391–396 (2011).
 24. Nishida, K. *et al.* Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice via regulation of p16INK4a and p21(WAF1/Cip1) expression. *Arthritis Rheum.* **50**, 3365–3376 (2004).

25. Grabiec, A. M., Korchynski, O., Tak, P. P. & Reedquist, K. A. Histone deacetylase inhibitors suppress rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte and macrophage IL-6 production by accelerating mRNA decay. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 424–431 (2012).
26. Horiuchi, M. *et al.* Expression and function of histone deacetylases in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J. Rheumatol.* **36**, 1580–1589 (2009).
27. Stanczyk, J. *et al.* Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis Rheum.* **63**, 373–381 (2011).
28. Stanczyk, J. *et al.* Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **58**, 1001–1009 (2008).
29. Nakamachi, Y. *et al.* MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **60**, 1294–1304 (2009).
30. Niederer, F. *et al.* Down-regulation of microRNA-34a* in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts promotes apoptosis resistance. *Arthritis Rheum.* **64**, 1771–1779 (2012).
31. Tlr-dependent, T. & Mills, K. H. G. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 807–822 (2011).
32. Darrah, E., Rosen, A., Giles, J. T. & Andrade, F. Peptidylarginine deiminase 2, 3 and 4 have distinct specificities against cellular substrates: Novel insights into autoantigen selection in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **71**, 92–98 (2012).
33. Kolfenbach, J. R. *et al.* Autoimmunity to Peptidyl Arginine Deiminase Type 4 Precedes Clinical Onset of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and rheumatism* **62**, 2633–2639 (2010).
34. Kharlamova, N. *et al.* Antibodies to Porphyromonas gingivalis Indicate

- Interaction Between Oral Infection, Smoking, and Risk Genes in Rheumatoid Arthritis Etiology. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* **68**, 604–613 (2016).
35. Mikuls, T. R. *et al.* Porphyromonas gingivalis and disease-related autoantibodies in individuals at increased risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **64**, 3522–3530 (2012).
 36. McInnes, I. B. & Schett, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2205–2219 (2011).
 37. Shi, J. *et al.* Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 17372–17377 (2011).
 38. Montes, A. *et al.* Anti-carbamylated protein antibodies as a reproducible independent type of rheumatoid arthritis autoantibodies. *PLoS One* **11**, 1–10 (2016).
 39. Jiang, X. *et al.* Anti-CarP antibodies in two large cohorts of patients with rheumatoid arthritis and their relationship to genetic risk factors, cigarette smoking and other autoantibodies. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 1761–1768 (2014).
 40. Brink, M. *et al.* Anti-carbamylated protein antibodies in the pre-symptomatic phase of rheumatoid arthritis, their relationship with multiple anti-citrulline peptide antibodies and association with radiological damage. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 1–8 (2015).
 41. Brzustewicz, E. & Bryl, E. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis - Practical and potential application of cytokines as biomarkers and targets of personalized therapy. *Cytokine* **76**, 527–536 (2015).
 42. Mateen, S., Zafar, A., Moin, S., Khan, A. Q. & Zubair, S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Chim. Acta* **455**, 161–171 (2016).
 43. Moelants, E. a V, Mortier, A., Van Damme, J. & Proost, P. Regulation of TNF- α with a focus on rheumatoid arthritis. *Immunol. Cell Biol.* **91**, 393–401

- (2013).
44. Chizzolini, C., Dayer, J.-M. M. & Miossec, P. Cytokines in chronic rheumatic diseases: is everything lack of homeostatic balance? *Arthritis Res Ther* **11**, 246 (2009).
 45. Koch, A. E. *et al.* Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8. *J. Immunol.* **147**, 2187–2195 (1991).
 46. Koch, A. E. *et al.* Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* **258**, 1798–1801 (1992).
 47. Krishnamurthy, A. *et al.* Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 721–729 (2016).
 48. Bottini, N. & Firestein, G. S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat. Rev. Rheumatol.* **9**, 24–33 (2013).
 49. Korb-Pap, A., Bertrand, J., Sherwood, J. & Pap, T. Stable activation of fibroblasts in rheumatic arthritis-causes and consequences. *Rheumatology (Oxford)*. **55**, ii64–ii67 (2016).
 50. Bartok, B. & Firestein, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* **233**, 233–255 (2011).
 51. Kyung Chang, S., Gu, Z. & Brenner, M. B. Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: The emerging role of cadherin-11. *Immunol. Rev.* **233**, 256–266 (2010).
 52. Rose, B. J. & Kooyman, D. L. A Tale of Two Joints: The Role of Matrix Metalloproteases in Cartilage Biology. *Dis. Markers* **2016**, (2016).
 53. Keyszer, G. *et al.* Circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1), and MMP-1/TIMP-1 complex in rheumatic disease. Correlation with clinical activity of rheumatoid arthritis versus other surrogate markers. *J. Rheumatol.* **26**, 251–258

(1999).

54. Cunnane, G., Fitzgerald, O., Beeton, C., Cawston, T. E. & Bresnihan, B. Early joint erosions and serum levels of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 3, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **44**, 2263–2274 (2001).
55. Itoh, T. *et al.* The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J. Immunol.* **169**, 2643–2647 (2002).
56. García, S. *et al.* Matrix metalloproteinase-8 deficiency increases joint inflammation and bone erosion in the K/BxN serum-transfer arthritis model. *Arthritis Res. Ther.* **12**, R224 (2010).
57. Macfarlane, L. A. & Todd, D. J. Kinase inhibitors: The next generation of therapies in the treatment of rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* **17**, 359–368 (2014).
58. Paunovic, V. & Harnett, M. M. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Drugs* **73**, 101–115 (2013).
59. Nah, S. S. *et al.* Epidermal growth factor increases prostaglandin E2 production via ERK1/2 MAPK and NF- κ B pathway in fibroblast like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* **30**, 443–449 (2010).
60. Thalhamer, T., McGrath, M. A. & Harnett, M. M. MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology* **47**, 409–414 (2008).
61. Tran, S. E. F., Holmström, T. H., Ahonen, M., Kähäri, V. M. & Eriksson, J. E. MAPK/ERK Overrides the Apoptotic Signaling from Fas, TNF, and TRAIL Receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 16484–16490 (2001).
62. Holmström, T. H. *et al.* MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. *EMBO J.* **19**, 5418–28 (2000).

63. Guma, M. & Firestein, G. S. c-Jun N-Terminal Kinase in Inflammation and Rheumatic Diseases. 220–231 (2012).
64. Dhanasekaran, D. N. & Reddy, E. P. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* **27**, 6245–51 (2008).
65. Huang, C., Rajfur, Z., Borchers, C., Schaller, M. D. & Jacobson, K. JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature* **424**, 219–223 (2003).
66. Schett, G., Zwerina, J. & Firestein, G. The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **67**, 909–916 (2008).
67. Tobiume, K. *et al.* ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep.* **2**, 222–228 (2001).
68. Lee, C. Y. *et al.* MicroRNA-mediated down-regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) attenuates the apoptosis of human mesenchymal stem cells (MSCs) transplanted into infarcted heart. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–12 (2016).
69. Terauchi, R. *et al.* The effect of apoptosis signal-regulating kinase 1 gene transfer on rat collagen induced arthritis. *J. Rheumatol.* **32**, 2373–2380 (2005).
70. Marone, R., Cmiljanovic, V., Giese, B. & Wymann, M. P. Targeting phosphoinositide 3-kinase-Moving towards therapy. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1784**, 159–185 (2008).
71. Gao, J. *et al.* MicroRNA-126 targeting PIK3R2 promotes rheumatoid arthritis synovial fibro-blasts proliferation and resistance to apoptosis by regulating PI3K/AKT pathway. *Exp. Mol. Pathol.* **100**, 192–198 (2016).
72. Rommel, C., Camps, M. & Ji, H. PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 191–201 (2007).
73. Bartok, B. *et al.* PI3 kinase?? is a key regulator of synoviocyte function in

- rheumatoid arthritis. *Am. J. Pathol.* **180**, 1906–1916 (2012).
74. Malemud, C. J. Growth hormone, VEGF and FGF: Involvement in rheumatoid arthritis. *Clinica Chimica Acta* **375**, 10–19 (2007).
75. García, S., Liz, M., Gómez-Reino, J. J. & Conde, C. Akt activity protects rheumatoid synovial fibroblasts from Fas-induced apoptosis by inhibition of Bid cleavage. *Arthritis Res. Ther.* **12**, R33 (2010).
76. Zhang, H. G. *et al.* Regulation of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by the protein kinase Akt. *Arthritis Rheum.* **44**, 1555–1567 (2001).
77. Camps, M. *et al.* Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* **11**, 936–43 (2005).
78. Han, Z., Boyle, D. L., Manning, a M. & Firestein, G. S. AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity* **28**, 197–208 (1998).
79. Okamoto, H., Cujec, T. P., Yamanaka, H. & Kamatani, N. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: Role of transcription factors. *FEBS J.* **275**, 4463–4470 (2008).
80. Brown, K. D., Claudio, E. & Siebenlist, U. The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **10**, 212 (2008).
81. Li, Q. & Verma, I. M. NF-κB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 725–734 (2002).
82. Bai, S. *et al.* NF-kappaB-regulated expression of cellular FLIP protects rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis. *Arthritis Rheum.* **50**, 3844–3855 (2004).
83. Bondeson, J., Foxwell, B., Brennan, F. & Feldmann, M. Defining therapeutic targets by using adenovirus: Blocking NF- B inhibits both inflammatory and

- destructive mechanisms in rheumatoid synovium but spares anti-inflammatory mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 5668–5673 (1999).
84. Miagkov, A. V *et al.* NF-kappaB activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13859–64 (1998).
85. Wagner, E. F. & Matsuo, K. Signalling in osteoclasts and the role of Fos / AP1 proteins. 83–86 (2003).
86. García, S., Bodaño, A., Pablos, J. L., Gómez-Reino, J. J. & Conde, C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition reduces tumor necrosis factor-induced inflammatory response in rheumatoid synovial fibroblasts. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 631–7 (2008).
87. Orosa, B., González, A., Mera, A., Gómez-Reino, J. J. & Conde, C. Lysophosphatidic acid receptor 1 suppression sensitizes rheumatoid fibroblast-like synoviocytes to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Arthritis Rheum.* **64**, 2460–2470 (2012).
88. Youn, J. *et al.* Regulation of TNF-alpha-mediated hyperplasia through TNF receptors, TRAFs, and NF-kappaB in synoviocytes obtained from patients with rheumatoid arthritis. *Immunol. Lett.* **83**, 85–93 (2002).
89. Alvaro-Gracia, J. M., Zvaifler, N. J. & Firestein, G. S. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by rheu. *J. Clin. Invest.* **86**, 1790–1798 (1990).
90. Garcia-Vicuna, R. *et al.* CC and CXC chemokine receptors mediate migration, proliferation, and matrix metalloproteinase production by fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* **50**, 3866–3877 (2004).
91. Lacey, D. *et al.* Control of fibroblast-like synoviocyte proliferation by

- macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis Rheum.* **48**, 103–109 (2003).
92. Matsumoto, S., Müller-Ladner, U., Gay, R. E., Nishioka, K. & Gay, S. Ultrastructural demonstration of apoptosis, Fas and Bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J. Rheumatol.* **23**, 1345–1352 (1996).
 93. Meinecke, I. *et al.* Modification of nuclear PML protein by SUMO-1 regulates Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5073–5078 (2007).
 94. Peng, S. L. Fas (CD95)-related apoptosis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **45**, 26–30 (2006).
 95. Korb, A., Pavenstädt, H. & Pap, T. Cell death in rheumatoid arthritis. *Apoptosis* **14**, 447–54 (2009).
 96. Calmon-Hamaty, F., Audo, R., Combe, B., Morel, J. & Hahne, M. Targeting the Fas/FasL system in Rheumatoid Arthritis therapy: Promising or risky? *Cytokine* **75**, 228–233 (2015).
 97. Pope, R. M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 527–535 (2002).
 98. Li, H. & Wan, A. Apoptosis of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes: Possible roles of nitric oxide and the thioredoxin 1. *Mediators Inflamm.* **2013**, (2013).
 99. Hashimoto, H. *et al.* Soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **41**, 657–662 (1998).
 100. Audo, R. *et al.* Distinct effects of soluble and membrane-bound Fas ligand on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 3289–3299 (2014).
 101. Hong, S. *et al.* TNF-alpha confers resistance to Fas-mediated apoptosis in rheumatoid arthritis through the induction of soluble Fas. *Life Sci.* **122**, 37–41 (2015).
 102. Hayashi, S. *et al.* Decoy receptor 3 expressed in rheumatoid synovial

- fibroblasts protects the cells against Fas-induced apoptosis. *Arthritis Rheum.* **56**, 1067–1075 (2007).
103. Zhang, H.-G. *et al.* Gene therapy that inhibits nuclear translocation of nuclear factor kappaB results in tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* **43**, 1094–1105 (2000).
104. Naval, J., Marzo, I. & Anel, A. Mecanismos celulares de muerte celular programada. *Hamatologica (ed. esp.)* **89**, 23 (2004).
105. Perlman, H. *et al.* Bcl-2 Expression in Synovial Fibroblasts Is Essential for Maintaining Mitochondrial Homeostasis and Cell Viability. *J. Immunol.* **164**, 5227–5235 (2000).
106. Firestein, G. S., Echeverri, F., Yeo, M., Zvaifler, N. J. & Green, D. R. Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 10895–10900 (1997).
107. Han, Z., Boyle, D. L., Shi, Y., Green, D. R. & Firestein, G. S. Dominant-negative p53 mutations in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **42**, 1088–1092 (1999).
108. Lefèvre, S. *et al.* Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat. Med.* **15**, 1414–20 (2009).
109. Zwerina, J. *et al.* TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 11742–7 (2007).
110. Korb-pap, A. *et al.* Early structural changes in cartilage and bone are required for the attachment and invasion of inflamed synovial tissue during destructive inflammatory arthritis. 1004–1011 (2012). doi:10.1136/annrheumdis-2011-200386
111. Peters, M. A. *et al.* The loss of alpha2beta1 integrin suppresses joint inflammation and cartilage destruction in mouse models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **64**, 1359–1368 (2012).
112. Echtermeyer, F. *et al.* Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and

- cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nat. Med.* **15**, 1072–1076 (2009).
113. Bertrand, J. *et al.* Syndecan 4 supports bone fracture repair, but not fetal skeletal development, in mice. *Arthritis Rheum.* **65**, 743–752 (2013).
 114. Lee, D. M. *et al.* Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science* **315**, 1006–1010 (2007).
 115. Lauzier, A., Charbonneau, M., Harper, K., Jilaveanu-Pelms, M. & Dubois, C. M. Formation of invadopodia-like structures by synovial cells promotes cartilage breakdown in collagen-induced arthritis: Involvement of the protein tyrosine kinase Src. *Arthritis Rheum.* **63**, 1591–1602 (2011).
 116. Lauzier, A., Charbonneau, M., Paquette, M., Harper, K. & Dubois, C. M. Transglutaminase 2 cross-linking activity is linked to invadopodia formation and cartilage breakdown in arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **14**, R159 (2012).
 117. Lauzier, A. *et al.* Snail is a critical mediator of invadosome formation and joint degradation in arthritis. *Am. J. Pathol.* **186**, 359–374 (2016).
 118. Shelef, M. A. *et al.* Focal adhesion kinase is required for synovial fibroblast invasion, but not murine inflammatory arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **16**, 464 (2014).
 119. Smolen, J. S. *et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 960–977 (2017).
 120. Rondeau, J.-M., Ramage, P., Zurini, M. & Gram, H. The molecular mode of action and species specificity of canakinumab, a human monoclonal antibody neutralizing IL-1 β . *mAbs* **7**, 1151–1160 (2015).
 121. Al Tanoury, Z., Piskunov, A. & Rochette-Egly, C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. *J. Lipid Res.* **54**, 1761–75 (2013).
 122. Karrer, P., Morf, R. & Schöpp, K. Zur Kenntnis des Vitamins-A aus Fischtranen. *Helv. Chim. Acta* **14**, 1036–1040 (1931).
 123. Das, B. C. *et al.* Retinoic acid signaling pathways in development and diseases.

- Bioorg. Med. Chem.* **22**, 673–83 (2014).
124. Noy, N. Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis. *Annu. Rev. Nutr.* **30**, 201–217 (2010).
125. Metzler, M. & Sandell, L. Enzymatic Metabolism of Vitamin A in Developing Vertebrate Embryos. *Nutrients* **8**, 812 (2016).
126. Chelstowska, S., Widjaja-Adhi, M. A. K., Silvaroli, J. A. & Golczak, M. Molecular basis for vitamin A uptake and storage in vertebrates. *Nutrients* **8**, (2016).
127. Sahu, B. & Maeda, A. Retinol Dehydrogenases Regulate Vitamin A Metabolism for Visual Function. *Nutrients* **8**, 746 (2016).
128. Germain, P. *et al.* International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacol Rev* **58**, 712–725 (2006).
129. Di Masi, A. *et al.* *Retinoic acid receptors: From molecular mechanisms to cancer therapy. Molecular Aspects of Medicine* **41**, (Elsevier Ltd, 2015).
130. Heyman, R. a *et al.* 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* **68**, 397–406 (1992).
131. Levin, A. A. *et al.* 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature* **355**, 359–61 (1992).
132. Kane, M. A. *et al.* Identification of 9-cis-retinoic acid as a pancreas-specific autacoid that attenuates glucose-stimulated insulin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 21884–9 (2010).
133. Kane, M. A. Analysis, occurrence, and function of 9-cis-retinoic acid. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1821**, 10–20 (2012).
134. Schug, T. T., Berry, D. C., Shaw, N. S., Travis, S. N. & Noy, N. Opposing Effects of Retinoic Acid on Cell Growth Result from Alternate Activation of Two Different Nuclear Receptors. *Cell* **129**, 723–733 (2007).
135. Berry, D. C. & Noy, N. Is PPAR β/δ a retinoid receptor? *PPAR Res.* **2007**,

- (2007).
136. Shaw, N., Elholm, M. & Noy, N. Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J. Biol. Chem.* **278**, 41589–41592 (2003).
 137. Noy, N. Non-classical transcriptional activity of retinoic acid. *Subcell. Biochem.* **81**, 179–199 (2016).
 138. Raffo, P. *et al.* Retinoid receptors: pathways of proliferation inhibition and apoptosis induction in breast cancer cell lines. *Anticancer Res.* **20**, 1535–1543 (2000).
 139. Niu, M. Y., Menard, M., Reed, J. C., Krajewski, S. & Pratt, M. A. Ectopic expression of cyclin D1 amplifies a retinoic acid-induced mitochondrial death pathway in breast cancer cells. *Oncogene* **20**, 3506–3518 (2001).
 140. Ahlemeyer, B., Huhne, R. & Krieglstein, J. Retinoic acid potentiated the protective effect of NGF against staurosporine-induced apoptosis in cultured chick neurons by increasing the trkA protein expression. *J. Neurosci. Res.* **60**, 767–778 (2000).
 141. Kitamura, M. *et al.* Intervention by retinoic acid in oxidative stress-induced apoptosis. *Nephrol. Dial. Transplant* **17 Suppl 9**, 84–87 (2002).
 142. Komura, H. *et al.* Retinoic acid enhances cell responses to epidermal growth factor in mouse mammary gland in culture. *Endocrinology* **118**, 1530–1536 (1986).
 143. Kistler, A. Structure-activity relationship of retinoids on lobuloalveolar differentiation of cultured mouse mammary glands. *Carcinogenesis* **7**, 1175–1182 (1986).
 144. Rochette-Egly, C. Retinoic acid signaling and mouse embryonic stem cell differentiation: Cross talk between genomic and non-genomic effects of RA. *Biochim. Biophys. Acta* **1851**, 2–11 (2014).
 145. Donato, L. J. & Noy, N. Suppression of mammary carcinoma growth by

- retinoic acid: Proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling. *Cancer Res.* **65**, 8193–8199 (2005).
146. Budhu, A. S. & Noy, N. Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2632–41 (2002).
147. Mangiarotti, R., Danova, M., Alberici, R. & Pellicciari, C. All-trans retinoic acid (ATRA)-induced apoptosis is preceded by G1 arrest in human MCF-7 breast cancer cells. *Br. J. Cancer* **77**, 186–91 (1998).
148. Schule, R. *et al.* Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 6092–6096 (1991).
149. Liu, R. Z. *et al.* Association between cytoplasmic CRABP2, altered retinoic acid signaling, and poor prognosis in glioblastoma. *Glia* **64**, 963–976 (2016).
150. Vreeland, A. C., Levi, L., Zhang, W., Berry, D. C. & Noy, N. Cellular retinoic acid-binding protein 2 inhibits tumor growth by two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* **289**, 34065–73 (2014).
151. Vreeland, A. C., Yu, S., Levi, L., de Barros Rossetto, D. & Noy, N. Transcript stabilization by the RNA-binding protein HuR is regulated by cellular retinoic acid-binding protein 2. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 2135–46 (2014).
152. Fischer-Huchzermeyer, S. *et al.* The Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2 Promotes Survival of Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor Cells. *Am. J. Pathol.* **187**, 1623–1632 (2017).
153. Lampron, C. *et al.* Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* **121**, 539–548 (1995).
154. Tan, N. *et al.* Selective Cooperation between Fatty Acid Binding Proteins and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Regulating Transcription

- Selective Cooperation between Fatty Acid Binding Proteins and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Regulating T. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5114–5127 (2002).
155. Schug, T. T. *et al.* Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from PPARbeta/delta to RAR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7546–7551 (2008).
 156. Nguyen, P. H. *et al.* All-trans retinoic acid targets gastric cancer stem cells and inhibits patient-derived gastric carcinoma tumor growth. *Oncogene* **35**, 5619–5628 (2016).
 157. van der Burg, B. *et al.* Retinoic acid resistance of estradiol-independent breast cancer cells coincides with diminished retinoic acid receptor function. *Mol. Cell. Endocrinol.* **91**, 149–157 (1993).
 158. Pratt, M. A. C., Niu, M. & White, D. Differential regulation of protein expression, growth and apoptosis by natural and synthetic retinoids. *J. Cell. Biochem.* **90**, 692–708 (2003).
 159. Manor, D. *et al.* Mammary carcinoma suppression by cellular retinoic acid binding protein-II. *Cancer Res.* **63**, 4426–4433 (2003).
 160. Hoang, T. C., Bui, T. K. L., Taguchi, T., Watanabe, T. & Sato, Y. All-trans retinoic acid inhibits KIT activity and induces apoptosis in gastrointestinal stromal tumor GIST-T1 cell line by affecting on the expression of survivin and Bax protein. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **29**, 165 (2010).
 161. Yang, Q.-J. *et al.* All-trans retinoic acid inhibits tumor growth of human osteosarcoma by activating Smad signaling-induced osteogenic differentiation. *Int. J. Oncol.* **41**, 153–160 (2012).
 162. Luo, P. *et al.* Retinoid-suppressed phosphorylation of RARalpha mediates the differentiation pathway of osteosarcoma cells. *Oncogene* **29**, 2772–2783 (2010).
 163. Liu, Z. *et al.* ATRA inhibits the proliferation of DU145 prostate cancer cells through reducing the methylation level of HOXB13 gene. *PLoS One* **7**,

- e40943 (2012).
164. Kotapalli, S. S. *et al.* All-trans-retinoic acid stimulates overexpression of Tumor protein D52 (TPD52, isoform 3) and neuronal differentiation of IMR-32 cells. *J. Cell. Biochem.* (2017). doi:10.1002/jcb.26090
 165. Marzinke, M. A. & Clagett-Dame, M. The all-trans retinoic acid (atRA)-regulated gene Calmin (Clmn) regulates cell cycle exit and neurite outgrowth in murine neuroblastoma (Neuro2a) cells. *Exp. Cell Res.* **318**, 85–93 (2012).
 166. Liu, Y. *et al.* All-trans retinoic acid arrests cell cycle in leukemic bone marrow stromal cells by increasing intercellular communication through connexin 43-mediated gap junction. *J. Hematol. Oncol.* **8**, 110 (2015).
 167. Babina, M., Artuc, M., Guhl, S. & Zuberbier, T. Retinoic Acid Negatively Impacts Proliferation and MCTC Specific Attributes of Human Skin Derived Mast Cells, but Reinforces Allergic Stimulability. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
 168. Mammadova, A. *et al.* Effects of retinoic acid on proliferation and gene expression of cleft and non-cleft palatal keratinocytes. *Eur. J. Orthod.* **36**, 727–734 (2014).
 169. Goodman, T. *et al.* Patterning of retinoic acid signaling and cell proliferation in the hippocampus. *Hippocampus* **22**, 2171–2183 (2012).
 170. Martire-Greco, D. *et al.* Novel Use of All-trans-Retinoic Acid in a Model of Lipopolysaccharide-immunosuppression to Decrease the Generation of Myeloid-derived Suppressor Cells by Reducing the Proliferation of CD34+ Precursor Cells. *Shock* (2016). doi:10.1097/SHK.0000000000000812
 171. Janesick, A., Wu, S. C. & Blumberg, B. Retinoic acid signaling and neuronal differentiation. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 1559–1576 (2015).
 172. Zouboulis, C. C. Retinoids--which dermatological indications will benefit in the near future? *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **14**, 303–315 (2001).
 173. Kang, S. *et al.* Application of retinol to human skin in vivo induces epidermal hyperplasia and cellular retinoid binding proteins characteristic of retinoic

- acid but without measurable retinoic acid levels or irritation. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 549–556 (1995).
174. Demczuk, M., Huang, H., White, C. & Kipp, J. L. Retinoic Acid Regulates Calcium Signaling to Promote Mouse Ovarian Granulosa Cell Proliferation. *Biol. Reprod.* **95**, 70 (2016).
 175. Abashev, T. M., Metzler, M. A., Wright, D. M. & Sandell, L. L. Retinoic acid signaling regulates Krt5 and Krt14 independently of stem cell markers in submandibular salivary gland epithelium. *Dev. Dyn.* **246**, 135–147 (2017).
 176. Mrass, P. *et al.* Retinoic acid increases the expression of p53 and proapoptotic caspases and sensitizes keratinocytes to apoptosis: A possible explanation for tumor preventive action of retinoids. *Cancer Res.* **64**, 6542–6548 (2004).
 177. Cheng, Y.-H., Utsunomiya, H., Pavone, M. E., Yin, P. & Bulun, S. E. Retinoic acid inhibits endometrial cancer cell growth via multiple genomic mechanisms. **150**, 137–143 (2016).
 178. Liu, H. *et al.* A novel all-trans retinoic acid derivative 4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinate inhibits the proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by inducing G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis via upregulation of p53 and ASPP1 and downregulat. *Oncol. Rep.* **36**, 333–341 (2016).
 179. Heo, S.-H., Kwak, J. & Jang, K. L. All-trans retinoic acid induces p53-dependent apoptosis in human hepatocytes by activating p14 expression via promoter hypomethylation. *Cancer Lett.* **362**, 139–148 (2015).
 180. Altucci, L. *et al.* Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nat. Med.* **7**, 680–686 (2001).
 181. Clarke, N., Jimenez-Lara, A. M., Voltz, E. & Gronemeyer, H. Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon anticancer signaling to death ligand TRAIL. *EMBO J.* **23**, 3051–3060 (2004).

182. Bernardo, A. R., Cosgaya, J. M., Aranda, A. & Jimenez-Lara, A. M. Pro-apoptotic signaling induced by Retinoic acid and dsRNA is under the control of Interferon Regulatory Factor-3 in breast cancer cells. *Apoptosis* (2017). doi:10.1007/s10495-017-1377-z
183. Latha Dhandapani, Ping Yue, Suresh S. Ramalingam, Fadlo R. Khuri, and S.-Y. S. Retinoic acid enhances TRAIL induced apoptosis in cancer cells by upregulating TRAIL receptor 1 expression. *Cancer Res.* **71**, 5245–5254 (2012).
184. Manna, S. K. & Aggarwal, B. B. All-trans-retinoic acid upregulates TNF receptors and potentiates TNF-induced activation of nuclear factors-kappaB, activated protein-1 and apoptosis in human lung cancer cells. *Oncogene* **19**, 2110–2119 (2000).
185. Witcher, M., Ross, D. T., Rousseau, C., Deluca, L. & Miller, W. H. J. Synergy between all-trans retinoic acid and tumor necrosis factor pathways in acute leukemia cells. *Blood* **102**, 237–245 (2003).
186. Mathieu, J., Flexor, M., Lanotte, M. & Besançon, F. A PARP-1/JNK1 cascade participates in the synergistic apoptotic effect of TNF α and all-trans retinoic acid in APL cells. *Oncogene* **27**, 3361–3370 (2008).
187. Engedal, N., Auberger, P. & Blomhoff, H. K. Retinoic acid regulates Fas-induced apoptosis in Jurkat T cells: reversal of mitogen-mediated repression of Fas DISC assembly. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 469–80 (2009).
188. Vorotnikova, E., Tries, M. & Braunhut, S. Retinoids and TIMP1 prevent radiation-induced apoptosis of capillary endothelial cells. *Radiat. Res.* **161**, 174–184 (2004).
189. Oritani, K., Kaisho, T., Nakajima, K. & Hirano, T. Retinoic acid inhibits interleukin-6-induced macrophage differentiation and apoptosis in a murine hematopoietic cell line, Y6. *Blood* **80**, 2298–2305 (1992).
190. Iwata, M., Mukai, M., Nakai, Y. & Iseki, R. Retinoic acids inhibit activation-induced apoptosis in T cell hybridomas and thymocytes. *J. Immunol.* **149**,

- 3302–3308 (1992).
191. Toth, R. *et al.* Activation-induced apoptosis and cell surface expression of Fas (CD95) ligand are reciprocally regulated by retinoic acid receptor alpha and gamma and involve nur77 in T cells. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1382–1391 (2001).
 192. Besnard, V. *et al.* Protective role of retinoic acid from antiproliferative action of TNF-alpha on lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **282**, L863–71 (2002).
 193. Choudhary, R., Baker, K. M. & Pan, J. All-trans retinoic acid prevents angiotensin II- and mechanical stretch-induced reactive oxygen species generation and cardiomyocyte apoptosis. *J. Cell. Physiol.* **215**, 172–181 (2008).
 194. Kholodenko, R. *et al.* Anti-apoptotic effect of retinoic acid on retinal progenitor cells mediated by a protein kinase A-dependent mechanism. *Cell Res.* **17**, 151–162 (2007).
 195. Chatterjee, A. & Chatterji, U. All-trans Retinoic Acid Ameliorates Arsenic-induced Oxidative Stress and Apoptosis in the Rat Uterus by Modulating MAPK Signaling Proteins. *J. Cell. Biochem.* (2017). doi:10.1002/jcb.26029
 196. Zanetti, A. *et al.* All-trans-retinoic Acid Modulates the Plasticity and Inhibits the Motility of Breast Cancer Cells: ROLE OF NOTCH1 AND TRANSFORMING GROWTH FACTOR (TGFβ). *J. Biol. Chem.* **290**, 17690–709 (2015).
 197. Dutta, A., Sen, T. & Chatterjee, A. All-trans retinoic acid (ATRA) downregulates MMP-9 by modulating its regulatory molecules. *Cell Adhes. Migr.* **4**, 409–418 (2010).
 198. Flamini, M. I. *et al.* Retinoic acid reduces migration of human breast cancer cells: Role of retinoic acid receptor beta. *J. Cell. Mol. Med.* **18**, 1113–1123 (2014).
 199. Sanchez, A. M., Shortrede, J. E., Vargas-Roig, L. M. & Flamini, M. I. Retinoic acid induces nuclear FAK translocation and reduces breast cancer cell

- adhesion through Moesin, FAK, and Paxillin. *Mol. Cell. Endocrinol.* **430**, 1–11 (2016).
200. Chen, C. *et al.* All-trans-retinoic acid modulates ICAM-1 N-glycan composition by influencing GnT-III levels and inhibits cell adhesion and trans-endothelial migration. *PLoS One* **7**, e52975 (2012).
201. Li, N. *et al.* All-trans retinoic acid suppresses the angiopoietin-Tie2 pathway and inhibits angiogenesis and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One* **12**, e0174555 (2017).
202. Young, M.-J. *et al.* All-trans retinoic acid downregulates ALDH1-mediated stemness and inhibits tumour formation in ovarian cancer cells. *Carcinogenesis* **36**, 498–507 (2015).
203. Cui, J. *et al.* All-trans retinoic acid inhibits proliferation, migration, invasion and induces differentiation of hepa1-6 cells through reversing EMT in vitro. *Int. J. Oncol.* **48**, 349–357 (2016).
204. Guan, J. *et al.* Retinoic acid inhibits pancreatic cancer cell migration and EMT through the downregulation of IL-6 in cancer associated fibroblast cells. *Cancer Lett.* **345**, 132–139 (2014).
205. Stock, A., Napolitani, G. & Cerundolo, V. Intestinal DC in migrational imprinting of immune cells. *Immunol. Cell Biol.* **91**, 240–9 (2013).
206. Darmanin, S. *et al.* All-trans retinoic acid enhances murine dendritic cell migration to draining lymph nodes via the balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *J Immunol* **179**, 4616–4625 (2007).
207. Latasa, M.-J., Jimenez-Lara, A. M. & Cosgaya, J. M. Retinoic acid regulates Schwann cell migration via NEDD9 induction by transcriptional and post-translational mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 1510–1518 (2016).
208. Rouzaire, M. *et al.* All-trans retinoic acid promotes wound healing of primary amniocytes through the induction of LOXL4, a member of the lysyl oxidase family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **81**, 10–19 (2016).

209. Comptour, A. *et al.* Lysyl oxidase-like 4 involvement in retinoic acid epithelial wound healing. *Sci. Rep.* **6**, 32688 (2016).
210. Hong, K. *et al.* All-trans retinoic acid attenuates experimental colitis through inhibition of NF-kappaB signaling. *Immunol. Lett.* **162**, 34–40 (2014).
211. Penny, H. L. *et al.* Restoring Retinoic Acid Attenuates Intestinal Inflammation and Tumorigenesis in APCMin/+ Mice. *Cancer Immunol. Res.* **4**, 917–926 (2016).
212. Conway, T. F. *et al.* Oral Delivery of Particulate Transforming Growth Factor Beta 1 and All-Trans Retinoic Acid Reduces Gut Inflammation in Murine Models of Inflammatory Bowel Disease. *J. Crohns. Colitis* **9**, 647–658 (2015).
213. Mielke, L. A. *et al.* Retinoic acid expression associates with enhanced IL-22 production by T cells and innate lymphoid cells and attenuation of intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **210**, 1117–1124 (2013).
214. Bai, A. *et al.* All-trans retinoic acid down-regulates inflammatory responses by shifting the Treg/Th17 profile in human ulcerative and murine colitis. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 959–969 (2009).
215. Kim, J. H. *et al.* All-trans-retinoic acid rescues neurons after global ischemia by attenuating neuroinflammatory reactions. *Neurochem. Res.* **38**, 2604–2615 (2013).
216. Chatterjee, A., Gogolak, P., Blottière, H. M. & Rajnavölgyi, É. The impact of ATRA on shaping human myeloid cell responses to epithelial cell-derived stimuli and on t-lymphocyte polarization. *Mediators Inflamm.* **2015**, (2015).
217. Harant, H. *et al.* Synergistic Activation of Interleukin-8 Gene Transcription by All-trans-retinoic Acid and Tumor Necrosis Factor-alpha Involves the Transcription Factor NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* **271**, 26954–26961 (1996).
218. Trentham, D. E. & Brinckerhoff, C. E. Augmentation of collagen arthritis by synthetic analogues of retinoic acid. *J. Immunol.* **129**, 2668–2672 (1982).
219. Brinckerhoff CE, Coffey JW, S. A. Inflammation and collagenase production

- in rats with adjuvant arthritis reduced with 13-cis-retinoic acid. *Science* **221**, (1983).
220. Kuwabara, K., Shudo, K. & Hori, Y. Novel synthetic retinoic acid inhibits rat collagen arthritis and differentially affects serum immunoglobulin subclass levels. *FEBS Lett.* **378**, 153–156 (1996).
221. Nozaki, Y. *et al.* Anti-inflammatory effect of all-trans-retinoic acid in inflammatory arthritis. *Clin. Immunol.* **119**, 272–9 (2006).
222. Kwok, S.-K. *et al.* Retinoic Acid Attenuates Rheumatoid Inflammation in Mice. *J. Immunol.* **189**, 1062–1071 (2012).
223. Naskar, D., Teng, F., Felix, K. M., Bradley, C. P. & Wu, H.-J. J. Synthetic Retinoid AM80 Ameliorates Lung and Arthritic Autoimmune Responses by Inhibiting T Follicular Helper and Th17 Cell Responses. *J. Immunol.* 1601776 (2017). doi:10.4049/jimmunol.1601776
224. Beehler, B. C. *et al.* Inhibition of disease progression by a novel retinoid antagonist in animal models of arthritis. *J. Rheumatol.* **30**, 355–363 (2003).
225. Kirchmeyer, M. *et al.* All-trans retinoic acid suppresses interleukin-6 expression in interleukin-1-stimulated synovial fibroblasts by inhibition of ERK1/2 pathway independently of RAR activation. *Arthritis Res. Ther.* **10**, R141 (2008).
226. Nozaki, Y. *et al.* All-trans-retinoic acid suppresses interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha; a possible therapeutic agent for rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* **26**, 810–817 (2006).
227. Jacobs, J. P. *et al.* Deficiency of CXCR2, but not other chemokine receptors, attenuates autoantibody-mediated arthritis in a murine model. *Arthritis Rheum.* **62**, 1921–1932 (2010).
228. Kouskoff, V. *et al.* Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* **87**, 811–822 (1996).
229. Chen, H.-C. Boyden chamber assay. *Methods Mol. Biol.* **294**, 15–22 (2005).

230. Zhang, Q. G., Qian, J. & Zhu, Y. C. Targeting bromodomain-containing protein 4 (BRD4) benefits rheumatoid arthritis. *Immunol. Lett.* **166**, 103–108 (2015).
231. Li, J. *et al.* Chmp 1A is a mediator of the anti-proliferative effects of all-trans retinoic acid in human pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer* **8**, 7 (2009).
232. Fan, J. *et al.* Silencing and re-expression of retinoic acid receptor beta2 in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 419–429 (2010).
233. Liu, Y. *et al.* Inhibition by all-trans-retinoic acid of transforming growth factor- β -induced collagen gel contraction mediated by human tenon fibroblasts. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 4199–4205 (2014).
234. Uray, I., Dmistrovsky, E., Br & Brown, P. Retinoids and Rexinoids in Cancer Prevention: From Laboratory to Clinic. *Semin Oncol.* **43**, 49–64 (2016).
235. Garattini, E. *et al.* Retinoids and breast cancer: from basic studies to the clinic and back again. *Cancer Treat. Rev.* **40**, 739–749 (2014).
236. Centritto, F. *et al.* Cellular and molecular determinants of all-trans retinoic acid sensitivity in breast cancer: Luminal phenotype and RARalpha expression. *EMBO Mol. Med.* **7**, 950–972 (2015).
237. Connolly, R. M., Nguyen, N. K. & Sukumar, S. Molecular pathways: Current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1651–1959 (2013).
238. Sirchia, S. M. *et al.* Evidence of epigenetic changes affecting the chromatin state of the retinoic acid receptor beta2 promoter in breast cancer cells. *Oncogene* **19**, 1556–1563 (2000).
239. Liu, Y. *et al.* Retinoic acid receptor beta mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1138–49 (1996).
240. Peng, X. *et al.* A novel RAR β isoform directed by a distinct promoter P3 and mediated by retinoic acid in breast cancer cells. *Cancer Res.* **64**, 8911–8918

- (2004).
241. Xu, X.-C. Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor- β in cancer. *Cancer Lett.* **253**, 14–24 (2007).
242. Liu, R.-Z. *et al.* CRABP1 is associated with a poor prognosis in breast cancer: adding to the complexity of breast cancer cell response to retinoic acid. *Mol. Cancer* **14**, 129 (2015).
243. Verma, A. K., Conrad, E. A. & Boutwell, R. K. Differential effects of retinoic acid and 7,8-benzoflavone on the induction of mouse skin tumors by the complete carcinogenesis process and by the initiation-promotion regimen. *Cancer Res.* **42**, 3519–3525 (1982).
244. Omenn, G. S. *et al.* Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* **334**, 1150–1155 (1996).
245. Bissonnette, R. *et al.* 9-cis Retinoic Acid Inhibition of Activation-Induced Apoptosis Is Mediated via Regulation of Fas Ligand and Requires Retinoic Acid Receptor and Retinoid X Receptor Activation. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5576–5585 (1995).
246. Yang, Y., Merćep, M., Ware, C. F. & Ashwell, J. D. Fas and activation-induced Fas ligand mediate apoptosis of T cell hybridomas: inhibition of Fas ligand expression by retinoic acid and glucocorticoids. *J. Exp. Med.* **181**, 1673–1682 (1995).
247. Morgan, E., Kannan-Thulasiraman, P. & Noy, N. Involvement of Fatty Acid Binding Protein 5 and PPAR β/δ in Prostate Cancer Cell Growth. *PPAR Res.* **2010**, 1–9 (2010).
248. Xia, S. L. *et al.* CRABP-II- and FABP5-independent responsiveness of human glioblastoma cells to all-trans retinoic acid. *Oncotarget* **6**, 5889–5902 (2015).
249. Nygaard, G. *et al.* Regulation and function of apoptosis signal-regulating

- kinase 1 in rheumatoid arthritis. *Biochem. Pharmacol.* 1–9 (2018). doi:10.1016/j.bcp.2018.01.041
250. Neergaard, M. De, Kim, J., Rank, F., Timmermans-wielenga, V. & Langerød, A. Epithelial-Stromal Interaction 1 (EPSTI1) Substitutes for Peritumoral Fibroblasts in the Tumor Microenvironment. **176**, 1229–1240 (2010).
 251. Nielsen, H. L., Ronnov-Jessen, L., Villadsen, R. & Petersen, O. W. Identification of EPSTI1, a novel gene induced by epithelial-stromal interaction in human breast cancer. *Genomics* **79**, 703–710 (2002).
 252. Li, T. *et al.* Identification of epithelial stromal interaction 1 as a novel effector downstream of Krüppel-like factor 8 in breast cancer invasion and metastasis. *Oncogene* **33**, 4746–4755 (2014).
 253. Chan, S., Tsai, J., Shen, C. & Liao, Y. Oleate-induced PTX3 promotes head and neck squamous cell carcinoma metastasis through the up-regulation of vimentin. **8**, 41364–41378 (2017).
 254. Ying, T., Lee, C., Chiou, H., Yang, S. & Lin, C. Knockdown of Pentraxin 3 suppresses tumorigenicity and metastasis of human cervical cancer cells. *Nat. Publ. Gr.* 1–12 (2016). doi:10.1038/srep29385
 255. Hu, F. Q., Qiao, T., Xie, X., Hu, R. & Xiao, H. B. Knockdown of the inflammatory factor pentraxin-3 suppresses growth and invasion of lung adenocarcinoma through the AKT and NF-kappa B pathways. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **28**, 649–657 (2014).
 256. Tung, J.-N. *et al.* Inhibition of pentraxin 3 in glioma cells impairs proliferation and invasion in vitro and in vivo. *J. Neurooncol.* **129**, 201–209 (2016).
 257. Hung, T.-W. *et al.* Pentraxin 3 Activates JNK Signaling and Regulates the Epithelial-To-Mesenchymal Transition in Renal Fibrosis. *Cell. Physiol. Biochem.* **40**, 1029–1038 (2016).
 258. Wang, W. *et al.* Modulation of platelet-derived microparticles to adhesion and motility of human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *PLoS One*

- 12**, e0181003 (2017).
259. Huang, T. L. *et al.* DDR2–CYR61–MMP1 Signaling Pathway Promotes Bone Erosion in Rheumatoid Arthritis Through Regulating Migration and Invasion of Fibroblast-Like Synoviocytes. *J. Bone Miner. Res.* **32**, 407–418 (2017).
260. Müller-Ladner, U. *et al.* Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am. J. Pathol.* **149**, 1607–15 (1996).
261. Huang, J. *et al.* VCAM1 expression correlated with tumorigenesis and poor prognosis in high grade serous ovarian cancer. *Am. J. Transl. Res.* **5**, 336–346 (2013).
262. Tan, T.-W. *et al.* Naringin suppress chondrosarcoma migration through inhibition vascular adhesion molecule-1 expression by modulating miR-126. *Int. Immunopharmacol.* **22**, 107–114 (2014).
263. Wang, P. C. *et al.* Activation of VCAM-1 and its associated molecule CD44 leads to increased malignant potential of breast cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 3560–3579 (2014).
264. Escribese, M. M. *et al.* Therapeutic effect of all-trans-retinoic acid (at-RA) on an autoimmune nephritis experimental model: Role of the VLA-4 integrin. *BMC Nephrol.* **8**, 1–12 (2007).
265. Lu, Z.-Y. *et al.* TNF-alpha enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in human bone marrow mesenchymal stem cells via the NF-kappaB, ERK and JNK signaling pathways. *Mol. Med. Rep.* **14**, 643–648 (2016).
266. Laragione, T., Brenner, M., Sherry, B. & Gulko, P. S. CXCL10 and its receptor CXCR3 regulate synovial fibroblast invasion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **63**, 3274–3283 (2011).
267. Li, Z. *et al.* Epithelial mesenchymal transition induced by the CXCL9/CXCR3 axis through AKT activation promotes invasion and

- metastasis in tongue squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* **39**, 1356–1368 (2018).
268. Umehara, H. *et al.* Fractalkine in Vascular Biology: From Basic Research to Clinical Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 34–40 (2004).
269. Volin, M. V., Huynh, N., Klosowska, K., Chong, K. K. & Woods, J. M. Fractalkine is a novel chemoattractant for rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte signaling through MAP kinases and Akt. *Arthritis Rheum.* **56**, 2512–2522 (2007).
270. Ruth, J. H. *et al.* Fractalkine, a novel chemokine in rheumatoid arthritis and in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **44**, 1568–1581 (2001).
271. Tsai, W.-H. *et al.* Monocyte chemotactic protein-1 in the migration of differentiated leukaemic cells toward alveolar epithelial cells. *Eur. Respir. J.* **31**, 957–962 (2008).
272. Luesink, M. *et al.* Chemokine induction by all-trans retinoic acid and arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia: triggering the differentiation syndrome. *Blood* **114**, 5512–5521 (2009).
273. Dunoyer-Geindre, S., Rivier-Cordey, A.-S., Tsopra, O., Lecompte, T. & Kruithof, E. K. O. Effect of ATRA and ATO on the expression of tissue factor in NB4 acute promyelocytic leukemia cells and regulatory function of the inflammatory cytokines TNF and IL-1 β . *Ann. Hematol.* **96**, 905–917 (2017).
274. Dubois, C. *et al.* Modulation of IL-8, IL-1 beta, and G-CSF secretion by all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* **8**, 1750–1757 (1994).
275. Shibakura, M. *et al.* Simultaneous induction of matrix metalloproteinase-9 and interleukin 8 by all-trans retinoic acid in human PL-21 and NB4 myeloid leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* **118**, 419–425 (2002).
276. Zirn, B. *et al.* All-trans retinoic acid treatment of Wilms tumor cells reverses

- expression of genes associated with high risk and relapse in vivo. *Oncogene* **24**, 5246–5251 (2005).
277. Ueki, S. *et al.* Retinoic acids are potent inhibitors of spontaneous human eosinophil apoptosis. *J. Immunol.* **181**, 7689–7698 (2008).
278. Kishimoto, K. *et al.* Therapeutic effect of retinoic acid on unilateral ureteral obstruction model. *Nephron. Exp. Nephrol.* **118**, e69-78 (2011).
279. Dai, X., Yamasaki, K., Shirakata, Y., Sayama, K. & Hashimoto, K. All-trans-retinoic acid induces interleukin-8 via the nuclear factor-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in normal human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **123**, 1078–1085 (2004).
280. Chang, M. M., Harper, R., Hyde, D. M. & Wu, R. A novel mechanism of retinoic acid-enhanced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**, 502–510 (2000).
281. Harant, H. *et al.* Regulation of interleukin-8 gene expression by all-trans retinoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 898–906 (1995).
282. Benbrook, D., Chambon, P., Rochette-Egly, C. & Asson-Batres, M. History of retinoic acid receptors. **70**, 75–102 (2014).
283. Hulkower, K. I. & Herber, R. L. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics* **3**, 107–124 (2011).